

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS HORTIFRUTICOLAS FRESCOS EN ATMOSFERA

CONTROLADA - EFECTO DEL DIOXIDO DE CARBONO SOBRE EL PARDEAMIENTO

ENZIMATICO DE MANZANAS.

Someto el presente trabajo realizado en el Departamento de Química, División Tecnología Química, de esta Facultad, bajo la dirección del Dr. Jorge O. Tomás, a la consideración de las autoridades correspondientes, para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas ( Orientación Tecnológica )

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge O. Tomás por su apoyo con oportunas sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.
- Al Dr. Alfredo Calvelo por haber permitido que el mismo se realice en los laboratorios bajo su dirección.
- Al Sr. Fausto Polo, gerente de FOOD Pedro Luro, por haber provisto la fruta para el presente trabajo.
- A CORFO Rio Colorado por el apoyo recibido durante el desarrollo de las experiencias y el interés demostrado por las mismas.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por su apoyo económico.
- A la Sra. Lucía Brandi de Quieto por la colaboración prestada en las tareas de almacenamiento..
- A los señores M.Petterini, E.Esmella y H.D'Alesandro, por la realización de las figuras que acompañan el texto.
- Por último, agradezco a mis compañeros del sector Tecnología Química y a todos aquellos que de una u otra manera han contribuido a la realización del mismo.

## FE DE ERRATAS (continuación)

Índice en punto 11.3.3 léase:

"Efectos de los distintos inhibidores de la oxidación en la extracción"

Hoja 9 en línea 20, léase:

"En general las fenolasas se inactivan por PH ácidos,....."

Hoja 23 en leyenda Fig. III.1, léase:

..." , 5) membrana; 6)...."

Hoja 24 en línea 1, léase:

..."con camisa de termostatzación...."

Hoja 25 en leyenda Fig. III.2, léase:

..."5) camisa de termostatzación, 6)...7) buzo magnético"

Hoja 61 en Fig. V.3

Considerar en el gráfico que las líneas entre 0 y 100 días de almacenamiento están extrapoladas.

Hoja 62 en línea 21, léase:

..."Con el fin de estudiar el efecto del tiempo ..."

Hoja 63 en línea 1, léase:

..."El sistema, que a nuestro entender,..."

Hoja 63 en línea 25, léase:

..."encontraron..."

Hojas 70,71 y 72 en Figs. VI.2,3 y 4

Idem Hoja 61, Fig. V.3

Hoja 73 en línea 26, léase:

..."en el cabo, cáliz y no en la piel."

Hoja 76 en línea 2, léase:

..."no parasitarias (fisiológicas)."

Hoja 77 en línea 4, léase:

..."aleatoriedad..."

## I N D I C E

<u>CAPITULO I.-</u> Introducción . . . . .	1
I.1.- Almacenamiento en atmósfera controlada. Efectos . . . . .	2
I.2.- Desarrollo comercial. . . . .	3
I.3.- Condiciones del almacenamiento en nuestro País. . . . .	5
<u>CAPITULO II.-</u> Extracción y purificación parcial de la polifenoloxidasas. . . . .	7
II.1.- Introducción . . . . .	7
II.1.1.- Naturaleza y propiedades del sistema polifenoloxidasas. . . . .	7
II.1.2.- Extracción y purificación de la polifenoloxidasas . . . . .	10
II.2.- Materiales y métodos . . . . .	11
II.2.1.- Localización de zonas de mayor actividad catecolasa. . . . .	11
II.2.2.- Obtención de polvos de acetona . . . . .	11
II.2.3.- Determinación del pH óptimo de reacción. . . . .	12
II.2.4.- Efecto de los distintos inhibidores de la oxidación en la ex - tracción . . . . .	12
II.2.5.- Extracción y purificación. . . . .	12
II.3.- Resultados . . . . .	13
II.3.1.- Localización de las zonas de mayor actividad catecolasa. . . . .	13
II.3.2.- Determinación del pH óptimo de reacción. . . . .	16
II.3.3.- Efecto de los distintos inhibidores de la oxidación en la ex - tracción . . . . .	16
II.3.4.- Extracción y purificación. . . . .	18
II.4.- Discusión. . . . .	18
<u>CAPITULO III.-</u> Determinación de la actividad catecolasa . . . . .	20
III.1.- Introducción. . . . .	20
III.1.1.- Métodos que miden el consumo de oxígeno . . . . .	20

III.1.1.a) Método manométrico . . . . .	20
III.1.1.b) Método eléctrico . . . . .	20
III.1.2.- Métodos que miden la formación de algún producto. . . . .	21
III.1.3.- Métodos que miden la oxidación acoplada de un reductor adic..	21
III.2.- Materiales y métodos. . . . .	22
III.2.1.- Construcción de un electrodo de oxígeno . . . . .	22
III.2.1.1.- Cátodo. . . . .	22
III.2.1.2.- Anodo . . . . .	22
III.2.1.3.- Electrolito . . . . .	22
III.2.1.4.- Armado del electrodo. . . . .	22
III.2.2.- Celda de reacción . . . . .	22
III.2.3.- Comportamiento del electrodo en la determinación de la activi <u>d</u> dad enzimática. . . . .	24
III.2.3.1.- Determinación del tiempo de respuesta . . . . .	24
III.2.3.2.- Evaluación de la respuesta en una reacción enzimática . . .	24
III.2.3.3.- Respuesta frente a distintas cantidades de solución enzim..	24
III.3.- Resultados. . . . .	24
III.3.1.- Determinación del tiempo de respuesta . . . . .	24
III.3.2.- Evaluación de la respuesta en una reacción enzimática . . . .	26
III.3.3.- Respuesta frente a distintas cantidades de solución enzimát..	29
III.3.4.- Cálculo de la precisión del método. . . . .	29
III.4.- Discusión . . . . .	31
<u>CAPITULO IV.- Efecto del dióxido de carbono sobre la actividad de la po</u> lifenoloxidasa de manzanas. . . . .	33
IV.1.- Introducción . . . . .	33
IV.2.- Materiales y métodos . . . . .	34
IV.2.1.- Solución enzimática purificada . . . . .	34

IV.2.2.- Solución enzimática cruda. . . . .	34
IV.2.3.- Determinación de la actividad. . . . .	34
IV.2.4.- Regulación de la concentración de dióxido de carbono . . . . .	35
IV.2.5.- Regulación de la temperatura . . . . .	36
IV.2.6.- Estudio del tipo de inhibición . . . . .	36
IV.3.- Resultados . . . . .	38
IV.3.1.- Regulación de la concentración de CO <sub>2</sub> . . . . .	38
IV.3.2.- Efectos del CO <sub>2</sub> . . . . .	38
IV.3.3.- Efectos de la temperatura. . . . .	42
IV.3.4.- Efectos del Cloruro de Sodio . . . . .	46
IV.4.- Discusión. . . . .	46
<u>CAPITULO V.- Almacenamiento de manzanas Granny Smith. Efecto de la com-</u>	
posición de la atmósfera sobre la act.de la polifenoloxidasas	50
V.1.- Introducción. . . . .	50
V.2.- Materiales y métodos. . . . .	51
V.2.1.- Frutos-Varietal-Procedencia . . . . .	51
V.2.2.- Cámaras frigoríficas. . . . .	51
V.2.3.- Celdas experimentales . . . . .	51
V.2.4.- Control de la humedad relativa. . . . .	53
V.2.5.- Obtención y regulación de la atmósfera. . . . .	53
V.2.6.- Esquema del ensayo de almacenamiento. . . . .	53
V.2.7.- Obtención de la polifenoloxidasas. . . . .	54
V.2.7.1.- Preparación de polvos de acetona. . . . .	54
V.2.7.2.- Obtención de la solución enzimática . . . . .	54
V.2.8.- Determinación del pH óptimo de reacción . . . . .	55
V.2.9.- Determinación de la actividad fenolasa. . . . .	55
V.2.10.- Variación de la actividad fenolasa con el tiempo de almacena-	
miento y la composición de la atmósfera. . . . .	56



V.3.- Resultados. . . . .	56
V.3.1.- Determinación del pH óptimo de reacción . . . . .	56
V.3.2.- Variación de la actividad fenolasa con el tiempo de almace- namiento y la composición de la atmósfera . . . . .	57
V.4.- Discusión . . . . .	62
<u>CAPITULO VI.- Efecto de la composición de la atmósfera y el tiempo de -</u> almacenamiento sobre algunos parámetros fisicoquímicos de manzanas Granny Smith . . . . .	65
VI.1.- Introducción . . . . .	65
VI.2.- Materiales y métodos . . . . .	66
VI.2.1.- Almacenamiento . . . . .	66
VI.2.2.- Determinación del contenido de sólidos solubles. . . . .	66
VI.2.3.- Sólidos totales. . . . .	66
VI.2.4.- pH . . . . .	66
VI.2.5.- Acidez titulable . . . . .	66
VI.2.6.- Compuestos fenólicos . . . . .	67
VI.2.7.- Pérdida de peso. . . . .	67
VI.3.- Resultados . . . . .	67
VI.4.- Discusión. . . . .	74
<u>CAPITULO VII.- Discusión General. . . . .</u>	76
<u>CAPITULO VIII.- Bibliografía. . . . .</u>	81
<u>CAPITULO IX.- Apéndices . . . . .</u>	85
Apéndice 1. . . . .	85
Apéndice 2. . . . .	89
Apéndice 3. . . . .	105

## INTRODUCCION

La importancia industrial y comercial que tiene en nuestros días el almacenamiento prolongado de productos hortifrutícolas frescos es indiscutible, ya que obvia la estacionalidad de los mismos, permitiendo que dichos productos puedan ser industrializados y comercializados en cualquier época del año.-

La calidad de los productos frescos almacenados es función de numerosos factores: temperatura de la cámara, humedad relativa, composición de la atmósfera que los rodea, momento de la cosecha, daños fisiológicos o mecánicos, etc.-

En este trabajo se estudia el efecto que las condiciones de almacenamiento tienen sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasa, ya que está ella relacionada con el pardeamiento que sufren los frutos dañados fisiológica o mecánicamente, reacción que afecta enormemente la calidad comercial de los mismos.-

El estudio lo hemos dividido en dos etapas, ante la complejidad que representa trabajar con fruta fresca. La primera de ellas consiste en investigar la acción del dióxido de carbono, en general principal componente del medio en almacenamiento en atmósfera controlada, sobre extractos crudos y parcialmente purificados de polifenoloxidasa de manzanas. En la segunda se observa el efecto del mismo compuesto, ahora "in vivo", o sea sobre fruta almacenada en distintos tipos de atmósferas, sobre la misma enzima y sobre otros parámetros.-

I.-

## ALMACENAMIENTO EN ATMOSFERA CONTROLADA - EFECTOS

1.- El objetivo de todo almacenamiento de productos hortifrutícolas frescos es desplazar el comienzo de la maduración propiamente dicha y por lo tanto de la senescencia.-

Ello puede lograrse en estos casos reduciendo la temperatura solamente, o disminuyendo la concentración de oxígeno del medio que los rodea, o aumentando la concentración de dióxido de carbono del mismo, o variando ambas concentraciones respecto a las del aire, con simultánea refrigeración.-

El almacenamiento refrigerado de productos en mezclas gaseosas distintas de aire, cuya composición se mantiene dentro de ciertos límites se denomina Almacenamiento en Atmósfera Controlada, (Controlled Atmosphere Storage).-

Mucho se ha trabajado en este sistema de almacenamiento de frutas. Fue comenzado a estudiar científicamente por Kidd y West, de la Food Investigation Organisation, en 1918, con la intención de prolongar la vida de almacenamiento de las manzanas inglesas, la mayoría de las cuales son susceptibles a sufrir daños por baja temperatura, cuando se las almacena por debajo de los 3-4°C.-

El almacenaje en atmósfera controlada permite trabajar a temperaturas más altas, merced a la reducción de la velocidad de respiración, provocada por la modificación de la atmósfera, además de la producida por el frío. (Flider, J.C. North, C.J., 1966; Kalugina, E.V., 1973; etc.).-

En general podemos decir: que la disminución del contenido de oxígeno, el aumento del dióxido de carbono y la disminución de la temperatura en la atmósfera de la cámara; prolongan la vida de almacenamiento de los productos hortifrutícolas frescos, con respecto a los almacenados en condiciones ambientales.-

Así Blandpied y Smock (1961), hallaron trabajando a tres niveles de dióxido de carbono, oxígeno y temperatura en la cámara, que a bajas temperaturas, bajas -

concentraciones de oxígeno y alto contenido de dióxido de carbono, las frutas (manzanas Mc Intosh) presentaron mayor firmeza y menor frecuencia de aparición de escaldaduras con respecto a las almacenadas en atmósfera normal (aire). Por el contrario las frutas mantenidas a altas concentraciones de dióxido de carbono, altas temperaturas y bajos valores de oxígeno, mostraron daños externos producidos por el dióxido de carbono.-

A conclusiones similares llegaron otros autores como Porritt, S.W. (1966); Stevenson, C.D.-Carroll, E.T. (1964); Wankier, B.N. et al. (1970); Patterson, Workman, (1962); etc.-

También se observó que las frutas almacenadas en atmósfera controlada presentan mayor acidez que las almacenadas en aire, (Kalugina, E.V., 1973; Minata, T. Minarmich, T., 1970; etc.), que son menos susceptibles a ciertos tipos de enfermedades tanto parasitarias como no parasitarias, tales como escaldaduras, bitterpitt, manchas pardas en la pulpa, debidas éstas últimas a daños mecánicos o fisiológicos, etc. (Fidler, J.C., 1973).-

## 2.- DESARROLLO COMERCIAL.

El proceso comercial fue desarrollado primeramente en el Reino Unido, aproximadamente en 1960, (Fidler, J.C., 1973), al que se le dió el nombre "refrigerated gas storage". Mas tarde fue adoptado en USA tomando el nombre dado anteriormente y adquiriendo un rápido desarrollo.-

Se sabe que ya al comienzo de la Segunda Guerra Mundial, en el Reino Unido existía una capacidad de almacenamiento en atmósfera controlada de aproximadamente 30.000 Tm, conservándose especialmente manzanas.-

En 1950 la capacidad ya ascendía a 70.000 Tm y en 1960 a 100.000 Tm (aproximadamente 1/6 de la producción total de manzanas y peras del Reino). En 1966 la capacidad fue de 175.000 Tm.-

A raíz de los buenos resultados obtenidos en el Reino Unido, el sistema de almacenamiento en atmósfera controlada se adoptó rápidamente en otros países, - así E.E.U.U. en 1965 contaba con una capacidad de 240.000 Tm, Italia en 1950 - apenas almacenaba en atmósfera controlada 50 Tm y en 1966 ya había alcanzado - las 110.000 Tm; Francia en 1962 no contaba con almacenes con atmósfera controlada, pero en 1970 ya almacenaba en dichas condiciones entre 270.000 y 330.000 Tm, (Fidler, J.C. et al., 1973).-

Los buenos resultados obtenidos se fundan en la acción bactericida y aún mejor en la fungicida del dióxido de carbono a altas concentraciones, lo que permite aumentar la humedad relativa del aire en el espacio de almacenaje, lo cual disminuye la pérdida de peso de los frutos (ella es 1/2 a 1/3 de la disminución - promedio en almacenamiento en frío). Esto sólo ya compensaría el aumento de - costos, el que se calcula es del 20% respecto al almacenamiento normal en frío (Plank, R., 1963).-

Comercialmente el almacenamiento en atmósfera controlada se puede realizar en - salas, tanques, cajas y envases pequeños, según el producto a almacenar, (frutas, jugos de frutas, huevos, carnes, etc.).-

La capacidad de las cámaras de almacenaje en atmósfera controlada para peras y manzanas, que generalmente se construyen en los lugares de producción, varía - entre 20 y 3.000 Tm, pudiéndose realizar el control de la atmósfera de dos maneras, según los niveles de oxígeno y dióxido de carbono utilizados. Ellas son:

- a) Controlando sólo el dióxido de carbono y dejando el oxígeno sin control. En este caso la composición de la atmósfera se regula por simple ventilación - (renovación de aire). Aquí la concentración de dióxido de carbono más la - concentración de oxígeno es igual al 21% en volúmen. Las concentraciones de dióxido de carbono son generalmente elevadas (mayores al 5%). Se utiliza para frutas poco sensibles al dióxido de carbono.-

- b) Se controla tanto el dióxido de carbono como el oxígeno, el que se regula, - como antes, por aireación y el exceso de anhídrido carbónico se absorbe en una torre de absorción (scrubber) con hidróxido de sodio, agua, etc. Las - concentraciones de dióxido de carbono son menores al 5% y las de oxígeno se mantienen entre 3 y 5%.-
- c) También se logra modificar la atmósfera envolviendo los productos con materiales semipermeables a los gases, como papeles aceitados o plásticos, lo - que implica un enriquecimiento en anhídrido carbónico y un empobrecimiento en oxígeno, como resultado de su propia respiración. Esto permite una mayor resistencia a daños mecánicos, durante transportes prolongados.-

No sólo manzanas se conservan en atmósfera controlada sino que también peras, - en las que se logra prolongar en dos a tres veces su período de conservabilidad- frutos de hueso (duraznos, ciruelas, damascos, etc.) y verduras como tomates, cebollas, coles, coliflor, etc., también se lo utiliza en la conservación de huevos y carnes frescas, lo que permite en este último caso su transporte - desde Australia y Nueva Zelandia hasta Inglaterra con gran éxito, dada la marcada preferencia de los consumidores por la carne fresca refrigerada frente a la congelada.-

### 3.- CONDICIONES DEL ALMACENAMIENTO EN NUESTRO PAIS.

En nuestro país, aunque no contamos con datos al respecto, podemos decir que - prácticamente no se almacena frutas en estas condiciones, a pesar que aproximadamente el 60% de la producción de manzanas y el 25% de la de peras se conservan en frigorífico y que aproximadamente el 50% de la producción de las mismas se exporta a distintos países, principalmente Brasil y Mercado Común Europeo.- (INTA, 1975; Boletín Estadístico Trimestral 1976).-

La capacidad total frigorífica destinada a frutas de nuestro país es de - - -

29.459.718 cajones o sea 589.149 Tm, (dato correspondiente a 1976), distribuída de la siguiente manera: 49,7% Río Negro; 8,5% Neuquén; 14,2% Capital Federal; 14,3% Mendoza; 10,7% Provincia de Buenos Aires y en el resto del país -- 2,6% (Boletín Estadístico Trimestral, 1976).-

Las frutas que se exportan principalmente son manzanas Red Delicious (Brasil), Granny Smith (Mercado Común Europeo) y peras, especialmente Packam's Triumph y D'Anjou (Mercado Común Europeo), siendo también las que más se cultivan, a -- excepción en el caso de las peras, en que la variedad que más se produce es la William's, pero dado su corto período de conservación, se consume casi en su totalidad durante el período de recolección (INTA, 1975).-

Por lo dicho en los últimos párrafos, consideramos que el presente trabajo será de interés económico pues tiende a hallar las mejores condiciones de conservabilidad de productos hortifrutícolas frescos aptos para ser exportados.-

## II.- EXTRACCION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA POLIFENOLOXIDASA

### 1.-INTRODUCCION:

Cuando una fruta, como manzana o pera, sufre daños mecánicos o fisiológicos, - tales como cortes, magulladuras, acumulación de productos respiratorios, etc,- se produce un rápido oscurecimiento de la zona afectada, lo cual hace que el - producto sea menos atractivo y pierda valor.-

Este oscurecimiento es lo que se conoce como pardeamiento enzimático, por ser- producido por la acción de una enzima; la polifenoloxidasa. Puede ser tanto in- terno como externo.-

Dado el efecto que el mismo tiene sobre la comercialización de dichos produc - tos se ha tratado de minimizarlo. Para ello se recurre a la eliminación del ai - re que rodea la fruta o sus trozos, ya sea por inmersión de los mismos en solu - ciones azucaradas, adición de ácidos para disminuir el pH, de antioxidantes o - sustancias reductoras (que actúan reduciendo la concentración de oxígeno o - - inhibiendo la enzima). Los aditivos de uso más frecuentes son: ácido ascórbico, ácido cítrico, sulfito de sodio o dióxido de azufre (Braverman, J.B.S., 1967). En el caso de los frutos frescos se trata de controlar dicho daño disminuyendo la temperatura de los almacenes y modificando la atmósfera que los rodea. Se - ha observado que el almacenamiento en atmósfera controlada disminuye la fre - cuencia de aparición del mismo durante el tiempo de almacenamiento, lo cual - nos indujo a pensar que la enzima responsable del mismo, es afectada por el - anhídrido carbónico, componente característico de la atmósfera en este sistema de almacenamiento.-

#### 1.1.- NATURALEZA Y PROPIEDADES DEL SISTEMA POLIFENOLOXIDASA:

Este daño producido por la polifenoloxidasa, es conocido desde hace mucho tiem -



po. Lindet (1895) puntualizó que el cambio de color que ocurre en las manzanas se debe a la oxidación de los taninos por una enzima semejante a la lacasa que se hallaba en el tejido de la fruta.-

Se ha investigado las enzimas oxidantes de las frutas (Lindet, 1895; Onslow, - 1920; Ponting, J.D. - Joslyn, M.A., 1948; Guadagni, et al. 1949; etc.) para - tratar de controlar dicha reacción.-

Onslow (1931) halla que las frutas que sufren pardeamiento contienen compues - tos con grupos o-dihidroxibenceno libres, como catecol, ácido protocatehuico y ácido cafeico. También observó que el oscurecimiento de estos compuestos en el tejido vegetal es más rápido que en solución acuosa y que el mismo no ocurría - cuando dicho tejido era hervido, lo cual lo lleva a postular la presencia de - una enzima que catalizaría la oxidación de dichos compuestos en presencia de - aire, dando como producto un peróxido.-

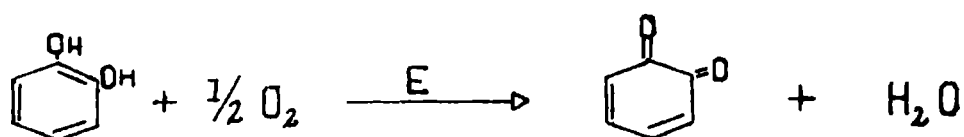
Szent - Györgyi (1925) demuestran que el oscurecimiento tiene lugar en ausen - cia de peroxidasa y más tarde se establece la existencia de oxidasa contienien - do cobre, que catalizarían la oxidación de los fenoles por el oxígeno molecu - lar.-

Actualmente se sabe que la enzima que cataliza dicha reacción es la polifenol - oxidasa (también denominada fenolasa, tirosinasa, catecolasa, clorogénicooxida - sa, o-difenoloxidasa), la que fue clasificada como o-difenol: O<sub>2</sub> oxidoreducta - sa, E.C. 1.10.3.1 por la IUB en 1964.-

La polifenoloxidasa es una enzima que contiene cobre como grupo prostético ac - tivo, que se hallaría como catión bivalente (Keilin, D. - Mann, T. 1938; Kubo - witz, F. 1937). Más recientemente se demostró que la forma activa está asocia - da con iones cobre monovalente positivo, lo que está de acuerdo con el hecho - de que el monóxido de carbono la inhibe, siendo éste un agente complejante tí - pico del ión cuproso (Lanzarini, G. et al. 1972).-

Las reacciones que cataliza, involucrando el oxígeno molecular pueden ser una o dos. El primer tipo de reacción es la hidroxilación de los monofenoles para dar o-dihidroxicompuestos, en las segundas ocurre la oxidación de éstos a quinonas. En general la actividad de la enzima es mucho mayor hacia los o-dihidroxiifenoles, que hacia los monofenoles. (Nelson, J.M. - Dawson, C.R. 1944; Ponting J.D. - Joslyn, M.A. 1948).-

El mecanismo de la reacción de oxidación no se ha establecido, pero se acepta como primer paso la formación de quinonas (Braverman, 1967; Joslyn, M.A. - -



Ponting, J.D. 1951) las que luego continúan reaccionando entre sí, con más - sustrato o con otras sustancias dando polímeros de alto peso molecular de co-  
lor pardo (Ponting, J.D. - Joslyn, M.A. 1957; Hulme, A.C. 1958).-

Sus principales sustratos son, como ya se dijo, los o-difenoles, como los áciidos protocatehuico, cafeico, cafetánico, dihidroxicinámicos, clorogénico, ta-  
ninos, etc. (Hulme, A.C. 1958; Williams, A.H. 1960; Hulme, A.C.- Rhodes, M.J.C. 1971).-

En general las fenolasas inactivan a pH ácidos, altas temperaturas, metales -  
pesados, monóxido de carbono, polivinilpirrolidona (PVP), tioles, agentes que uen-  
lantes del cobre, etc. y por los mismos productos de la reacción. (Ponting, J.D. 1957; Walker, J.R.L. 1965).-

Por otra parte el pardeamiento enzimático no ocurre en las células intactas, -  
sino cuando ellas sufren algún tipo de alteración pues la enzima y sus sustrau-  
tos se hallan especialmente separados en la célula sana (Kramer, P.J. 1955; -  
Forsyth, W.G.C. 1964; Anderson, J.W. 1968; Swain, T. 1968).-

## 1.2.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA POLIFENOLOXIDASA:

La polifenoloxidasa ha sido extraída de distintas fuentes como hongos, manzanas, papas, etc., presentando diferencias en sus propiedades según su origen (Dizik, N.S. - Knapp, F.N. 1970; Dall'Aglio, G. - Casoli, 1970; Stelzig, D.A. - et al. 1972).-

La aislación de enzimas de algún organismo implica la ruptura de tejido y la consiguiente mezcla de sustancias, lo que puede provocar la inactivación o modificación de las mismas.-

En los tejidos vegetales la principal interacción la ejercen los fenoles, muy distribuidos en este reino.-

Los compuestos fenólicos, que en la célula viva se hallan en las vacuolas, son rápidamente oxidados a quinonas, taninos condensados y pigmentos pardos durante la extracción de tejidos vegetales.-

Las quinonas formadas, compuestos altamente reactivos, oxidan otras sustancias, se polimerizan rápidamente y además reaccionan con las proteínas, dando compuestos covalentes, e inhibiendo por lo tanto su actividad, (Anderson, J.W. - 1968; Loomis, W.D. - Battaile, J. 1966; Ingraham, L.I. 1955). Por otra parte los compuestos fenólicos mismos forman puentes de hidrógeno muy fuertes con las uniones peptídicas de las proteínas, probablemente a través del oxígeno peptídico. (Loomis, W.D. - Battaile, J. 1966).-

De lo dicho anteriormente se ve que para evitar la pérdida de actividad de las enzimas durante su extracción es necesario separar los fenoles endógenos del vegetal y evitar su posible oxidación.-

Con ese fin se puede, ya sea, absorber los fenoles (polímeros, polivinilpirrolidona, etc.), eliminar las quinonas, por reducción nuevamente a fenol (ascorbato) o por condensación con algún compuesto (tioles) para dar otro que no sufra futura oxidación (Anderson, J.W. 1968), o triturar el tejido en presencia-

de solventes orgánicos, tal como acetona pre-enfriada (Ponting, J.D.-Joslyn,- M.A. 1948).-

Luego, una vez eliminados los polifenoles, la aislación puede continuarse por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (Samorodova-Bianki et al. - - 1971; Dall'Aglia, G. 1970; etc.) por extracción con detergentes como el tritón X-100 (Harel, E. 1964, 65; Stelzig, D.A. et al. 1972; Walker, J.R.L.-Hulme, A.C. 1965, 1966; Mason, H.S. 1955; etc.) filtración a través de geles o por - electroforesis (Harel, E. 1964/65).-

## 2.- MATERIALES Y METODOS.

La enzima se extrajo de manzanas Red Delicious adquiridas en el comercio lo - cal. Se tomaron porciones de piel con la pulpa adherida a ella y del endocar- pio, formando un total de 20 gr para cada muestra.-

### 2.1.- Localización de las zonas de mayor actividad catecolasa:

Las zonas de tejido de mayor actividad catecolasa se determinaron rociando - discos de manzana con una solución de catecol 0,037 M. Además se realizaron - extractos crudos (tritурados de tejido en buffer) de las zonas corazón, pulpa y piel, los que se utilizaron como solución enzimática, a las que se les de - terminó su actividad, utilizando catecol como sustrato, como se describe lue- go (2.3).-

### 2.2.- Obtención de polvos de acetona:

Se obtienen triturando el tejido vegetal en presencia de acetona pre-enfriada (-20°C), (1:1,5 p/v), filtrando por succión. La torta obtenida se resuspende - en acetona, siempre pre-enfriada y se filtra nuevamente. Esta operación se - realiza tre veces más, secando finalmente por succión. El polvo obtenido se - deja secar a temperatura ambiente en un lugar seco. Finalmente se guardan a -

-20° C en lugar seco, hasta el momento de ser usados.-

### 2.3.- Determinación del pH óptimo de reacción:

Para observar la variación de la actividad con el pH se disolvieron 100 mg de polvo de acetona (punto anterior) en 15 ml del buffer del pH adecuado. Se utilizaron buffers fosfato desde pH 5,0 hasta 8,0, preparados de acuerdo al Handbook of Chemistry and Physics, 48 th edition 1967-1968. El pH de las soluciones se controló con un pH-metro Methrom-Herisau. La reacción se siguió colorimétricamente con un Spectronic 20, realizando las lecturas a 410 nm (longitud de onda en la zona donde la absorbancia varía menos con la misma, según se determinó mediante el espectro correspondiente). Se usó catecol 0,037 M como sustrato. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.-

### 2.4.- Efecto de los distintos inhibidores de la oxidación en la extracción:

Para minimizar la oxidación de los fenoles endógenos durante la extracción se ensayó la eficacia de los siguientes inhibidores de la oxidación:

sacarosa 0,3 M + clorhidrato de cisteína 0,013 M + EDTA  $10^{-4}$  M

sacarosa 0,3 M + clorhidrato de cisteína 0,013 M

sacarosa 0,3 M + EDTA  $10^{-4}$  M

clorhidrato de cisteína 0,013 M

sacarosa 0,3 M + ascorbato sódico 0,01 M

En todos los casos se determina la actividad enzimática mediante el método - que se describe en el capítulo siguiente. La concentración de proteínas se valora con el método de Lowry.-

### 2.5.- Extracción y purificación:

Se tritura en mortero de vidrio 20 gr de tejido con 30 ml de buffer fosfato - 0,1 M a pH 6,5 en presencia de sacarosa 0,3 M; clorhidrato de cisteína 0,2% y

EDTA  $10^{-4}$  M. El homogeneizado se centrifugó a 1000 g durante 30 minutos. El pre cipitado se reextrae tres veces más con 10 ml de buffer cada vez. Luego se rea liza una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Primero al 40% de sa turación y luego al 100%. Este precipitado se disuelve en la menor cantidad de buffer posible y se dializa versus agua destilada durante 20 horas. La solu - ción resultante se lleva a una columna de 36 cm de alto por 3 cm de diámetro - de Sephadex G-200 y se eluye con buffer fosfato 0,01 M, pH 6,5. La velocidad - de flujo fue de 36 ml por hora. Se recogieron fracciones de 5-10 ml. Las frac - ciones de mayor actividad se reunieron y almacenaron en congelación o refrige - ración hasta el momento de su uso. Todas las etapas de la extracción se reali - zaron a baja temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$ ). En cada paso se determina la actividad enzimá - tica, como se indica en el próximo capítulo y el contenido de proteínas, utili - zando el método de Lowry.-

### 3.- RESULTADOS.

#### 3.1.- Localización de las zonas de mayor actividad catecolasa:

Estos ensayos se realizaron previamente con el fin de ubicar las zonas del fru - to con mayor concentración de enzima, las cuales luego serían utilizadas en la extracción de la misma.-

Al rociar discos de manzanas se observó que en pocos minutos aparecía color - pardo en la periferia y en el corazón, y no en la zona intermedia, en la que - se vieron puntos de color mucho más claro.-

Lo mismo se observó al medir la actividad fenolasa de las soluciones obtenidas a partir de los homogenatos de las distintas zonas de tejido. La actividad en - zimática en este caso fue medida espectrofotométricamente a 410 nm (la longi - tud de onda elegida pertenece a la zona del espectro donde se produce la menor - variación de la absorbancia con la misma, fig. II-1). Los gráficos que se obtu -

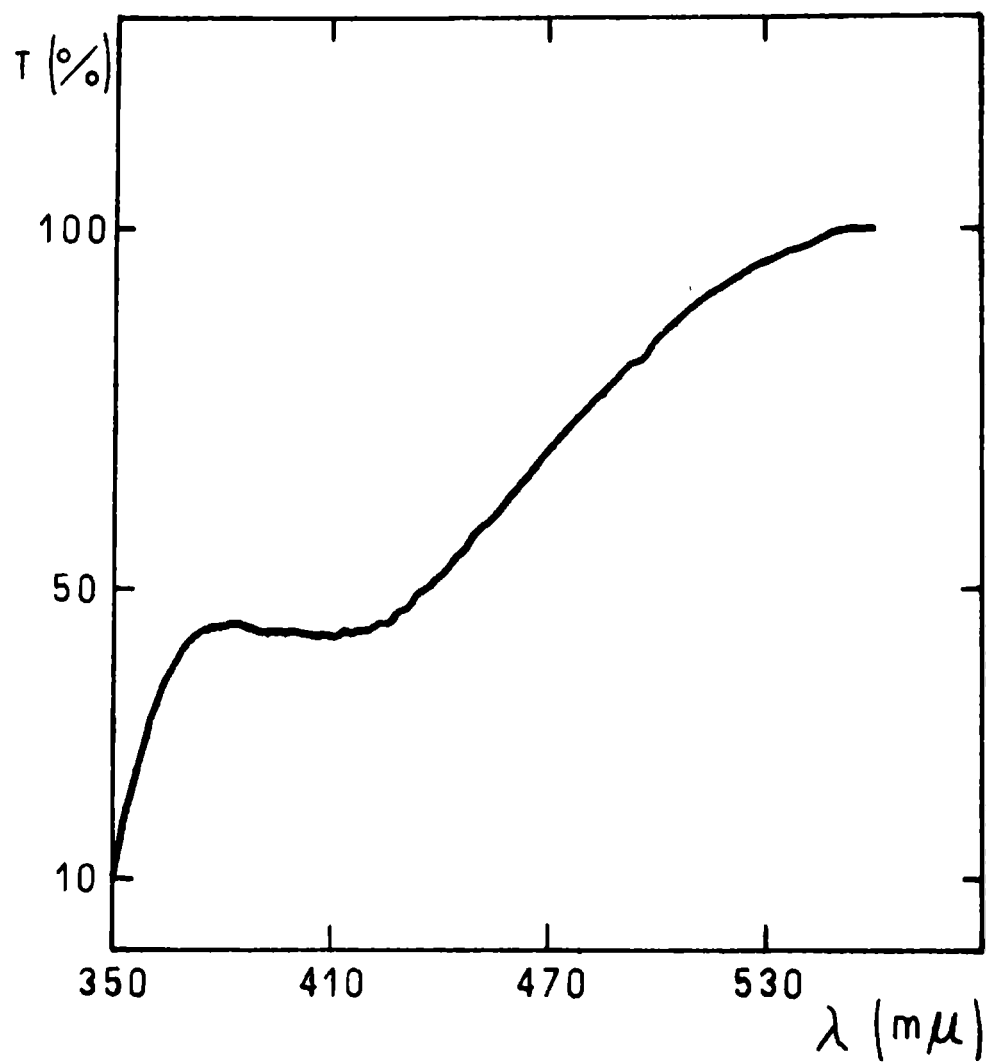


FIG. II-1

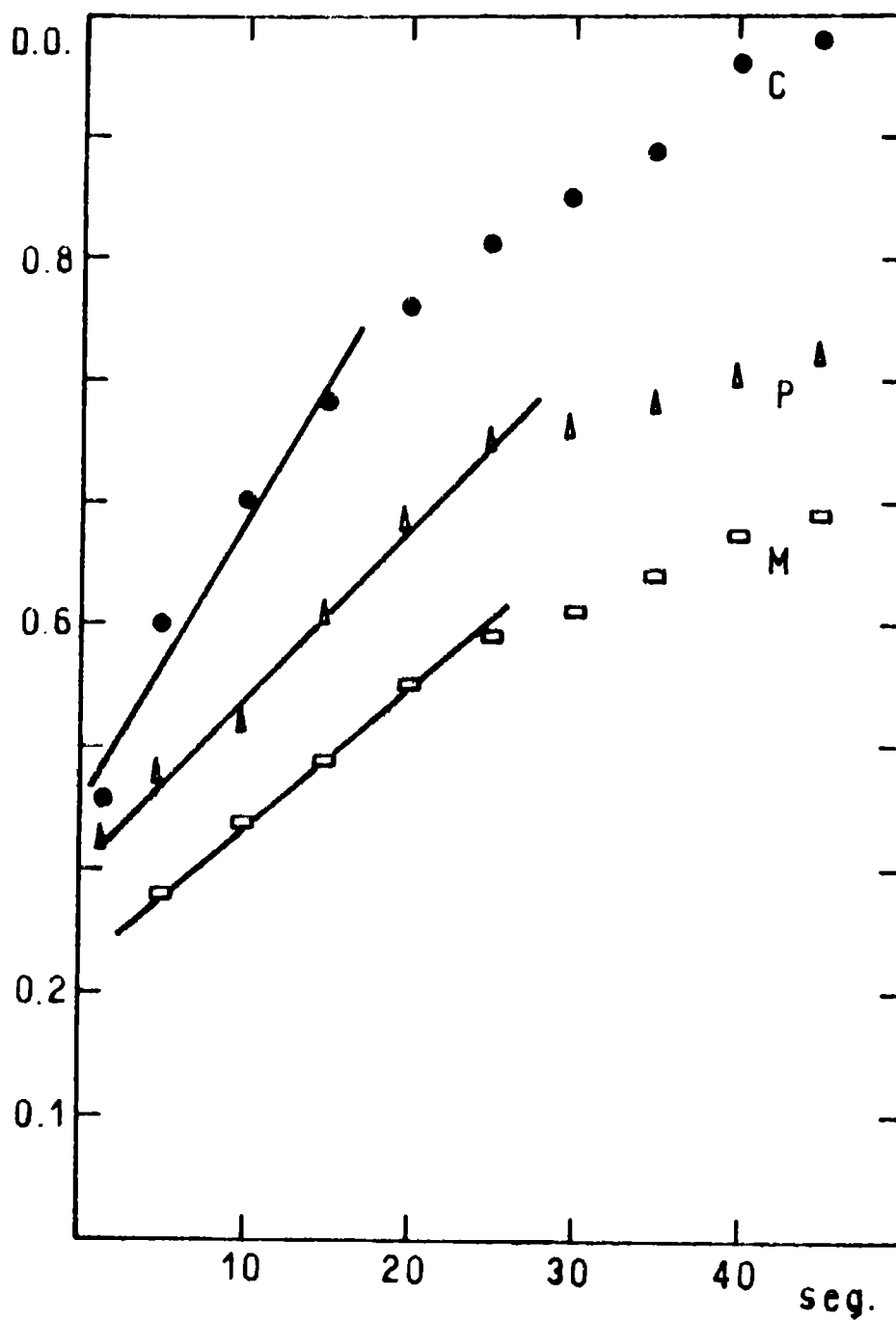


FIG. II-2



vieron son del tipo presentado en la figura II-2.-

Luego, de estos resultados, se concluye que la actividad enzimática disminuye en el siguiente orden: Corazón, epidermis y pulpa. Los datos obtenidos concuerdan con los hallados en la bibliografía (Sal'kova, E.G. 1970).-

### 3.2.- Determinación del pH óptimo de reacción:

Para realizar las medidas de actividad posteriores fue necesario determinar previamente el pH óptimo de reacción. Se realizó midiendo la actividad enzimática a distintos pH, obteniéndose el gráfico II-3. Del mismo se halla que el pH óptimo de reacción para el sistema buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  es 6,8.-

### 3.3.- Efecto de distintos inhibidores de la oxidación en la extracción:

Los inhibidores de la oxidación que hemos ensayado durante la extracción de la polifenoloxidasas son: ascorbato sódico, EDTA y clorhidrato de cisteína. Estos reactivos se utilizaron tanto solos como combinados, siempre en presencia de sacarosa como protector. Los resultados obtenidos son:

SUSTANCIA	Actividad específica (u/mg)	Actividad relativa (%)	COLOR EXTRACTO
sacarosa 0,3M + HCl-Cys 0,013M	2,58	100	verde claro
EDTA $10^{-4}\text{M}$			amarillento
sacarosa 0,3M + HCl-Cys 0,013M	2,40	93	Idem 1º
sacarosa 0,3M + EDTA $10^{-4}\text{M}$	1,55	59	Parduzco
HCl-Cys 0,013M	1,88	73	Idem 1º
Sacarosa 0,3M + ascorbato de sodio 0,01M	2,16	84	Idem 1º

HCl-Cys: Clorhidrato de cisteína.-

Luego, los mejores resultados se obtienen trabajando con la primer mezcla, o sea, sacarosa 0,3M + HCl-Cys 0,013M + EDTA  $10^{-4}\text{M}$ .-

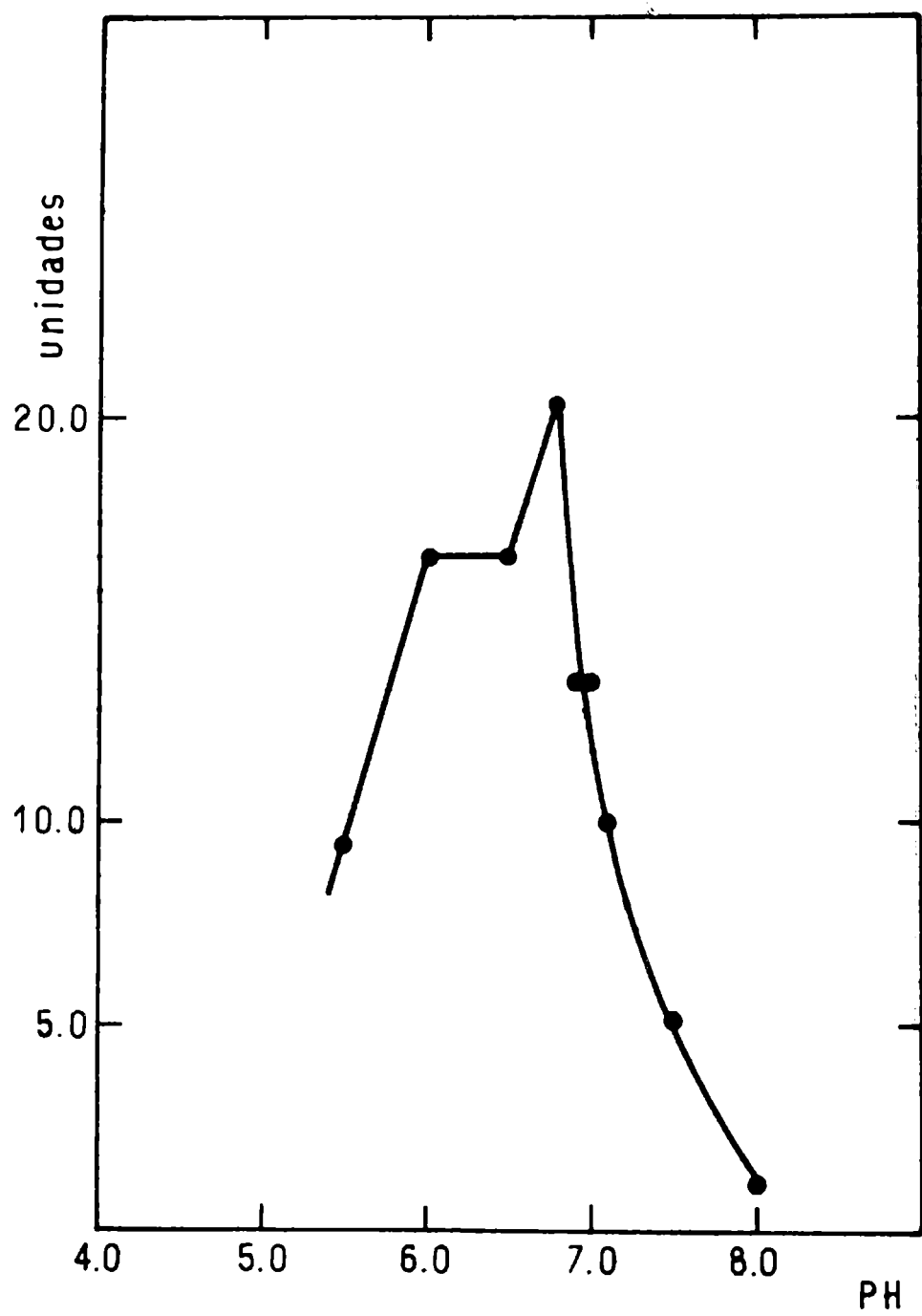


FIG. II-3

### 3.4.- Extracción y purificación:

Un cuadro típico para los distintos pasos de extracción y purificación es el siguiente (La unidad de la actividad se define como la cantidad de enzima que provoca una variación de 0,1 mV por minuto al comienzo de la reacción).-

Paso	Vol. (ml)	actividad (u/ml)	actividad total	Proteínas		Actividad específica
				mg/ml	totales	
extracto en buffer	48,5	10,05	487,42	2,21	107,2	4,55
ppdo c/SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 40-100% sat.	15,0	13,40	201,00	0,15	3,25	89,3
eluato Sephadex (frac.más activas)	22,0	2,1	46,20	0,01	0,22	210,0

En todas las extracciones realizadas la purificación que se logra es aproximadamente cuarenta veces.-

La  $K_m$  (constante de disociación del complejo enzima-sustrato) para el catecol de la solución obtenida es  $4,6 \times 10^{-3} M$ .-

### 4.- DISCUSION:

Como en los ensayos previos se halló que las zonas de mayor actividad catecolasa son el corazón y piel de la fruta, se utilizaron dichas partes en la preparación de las muestras de tejido.-

A fin de minimizar la oxidación de los fenoles endógenos durante la extracción se ensayó la eficacia de distintos inhibidores de la oxidación. Los mejores resultados se obtuvieron adicionando sacarosa, clorhidrato de cisteína y EDTA.-

Se sabe que el clorhidrato de cisteína (HCl-Cys) reacciona con las quinonas formando productos que no sufren posterior oxidación y, por lo tanto, no inhiben la actividad enzimática (Anderson, J.W. 1968). El EDTA, es un complejante del cobre y se ha visto que es un débil inhibidor de la catecolasa (Luh, B.S.-

Phitakpol, B.J. 1972).-

La extracción se realizó a pH 6,5 a pesar de haberse determinado anteriormente que el pH óptimo de reacción es 6,8; de esta forma, también, se produce menos oxidación.-

El extracto crudo obtenido es de color verde claro amarillento.-

Luego, se procedió a separar la enzima por precipitación fraccionada con  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ . Al 40% de saturación se obtiene muy poco precipitado que no posee actividad catecoloxidasa. Experimentalmente se halla que se debe precipitar a 100% de saturación, ya que haciéndolo a porcentajes menores persiste actividad enzimática en el sobrenadante.-

El precipitado obtenido se disuelve en buffer, dando una solución que se dializa contra agua. Durante la diálisis se forma un precipitado oscuro que no posee actividad fenolasa.-

La solución anterior, luego de centrifugada, se pasa por una columna de Sephadex G-200 y se eluye con buffer 0,01M, pH 6,5 para separar las fracciones de mayor actividad.-

La solución enzimática obtenida tiene una actividad específica aproximadamente 40 veces mayor que la solución original, hecho que se repite en todas las extracciones realizadas.-

Luego, podemos concluir que el sistema sacarosa, clorhidrato de cisteína, EDTA permite extraer la enzima polifenoloxidasa con oxidación mínima de los polifenoles endógenos de la fruta y que el método de extracción utilizado logra una purificación de aproximadamente 40 veces.-

### III.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATECOLASA.

1.- Introducción: Existen diversos métodos para medir la actividad catecolasa de la polifenoloxidasas; ellos valoran ya sea el consumo de oxígeno, la formación de algún producto o la oxidación acoplada de algún agente reductor adicionado, pero ninguno de ellos mide directamente la transformación de un o-difenol, pues los productos de la actividad enzimática son muy reactivos y reaccionan no sólo uno con otro, sino que también con sustrato nativo y con oxígeno, lo que hace prácticamente imposible realizar medida alguna (Mason, H.S. 1955).-

De acuerdo a lo que miden, los métodos se pueden clasificar en:

#### 1.1.- Métodos que miden el consumo de oxígeno:

a) Método manométrico: Es el método respirométrico de Warburg tradicional. Actualmente es poco usado pues posee un gran error, ya que durante la medida, - de bastante duración, ocurren reacciones secundarias, siendo por lo tanto la velocidad inicial de reacción casi imposible de medir. Por otra parte, el equilibrio entre la fase gaseosa y la líquida es pobre (Ponting, J.D. 1948).-

b) Método eléctrico: En este caso se usan distintos tipos de electrodos, para evaluar el oxígeno consumido. Uno de los más usados es el electrodo polarográfico de Clark, que está compuesto por un cátodo de platino, de pequeña superficie y un ánodo de plata. Se halla recubierto por una membrana, dentro de la cual la concentración de oxígeno se mantiene casi nula por la reacción electroquímica. Esta membrana es permeable al oxígeno, pero impermeable al agua y a los electrolitos. Como influye mucho la difusión del oxígeno a través de la membrana, es necesaria una buena agitación. La velocidad de difusión es proporcional a la presión parcial de oxígeno fuera de la membrana.-

Experimentalmente se vió que la velocidad de reacción es independiente del vo

lúmen de la fase gaseosa sobre la mezcla de reacción, lo que implica que la mezcla está totalmente equilibrada con oxígeno (Mayer, A.M. et al. 1966).-

#### 1.2.-Métodos que miden la formación de algún producto:

Es el método espectrofotométrico. Mide la transformación de un o-difenol (generalmente 4-metil catecol o catecol), en las primeras etapas de reacción, o sea cuando se ha formado la o-quinona, lo que implica la aparición de color amarillo (Baruah, P. et al. 1953) y presenta la ventaja de que en él casi no ocurren reacciones secundarias durante la determinación. La medida se realiza en los primeros minutos de reacción. Se puede determinar perfectamente la velocidad inicial de reacción.-

#### 1.3.-Métodos que miden la oxidación acoplada de un reductor adicionado:

Es el denominado método cronométrico, desarrollado por Miller, W.H. - Mallette M.F. et al. en 1944. Esta técnica implica la medida del tiempo necesario para que una cantidad dada de enzima produzca o-benzoquinona en una cantidad justo-en exceso a lo necesario para oxidar una pequeña cantidad de ácido ascórbico - adicionada al sistema. Luego, no hay reacciones secundarias. Permite determinar la velocidad inicial de reacción.-

En nuestro caso, ante la necesidad de evaluar la actividad enzimática a temperaturas determinadas, entre 0 y 20°C y en presencia de dióxido de carbono, decidimos utilizar el método eléctrico por ser más rápido que los métodos manométrico y cronométrico y ante la imposibilidad de utilizar un espectrofotómetro que pueda trabajar a bajas temperaturas controladas.-

El electrodo que elegimos es del tipo autogenerante, de membrana de fácil construcción, originalmente diseñado para ser usado en fermentadores biológicos (Johnson, M. et al. 1964/1967).-

## 2.- MATERIALES Y METODOS:

### 2.1.- Construcción de un electrodo de oxígeno:

2.1.1.- Cátodo: Se construyó con plata electrolítica, trefilada en alambre de 0,6 mm de diámetro. Ella se arrolló en una espiral ajustada, de diámetro igual al diámetro exterior del tubo que contendrá los electrodos, cuyo extremo se soldó a un cable conductor. Esta unión se aisló con un cemento de contacto, diluido con metil etil cetona. Se dejó secar y se cubrió con un tubo plástico hinchado en cloroformo. Cuando se evapora el solvente queda un cierre ajustado.

2.1.2.- Anodo: Para su construcción se usó plomo en planchas, Merck (con 0,002% de cobre) de 0,3 mm de espesor. Se cortó una cinta de 4 mm de ancho y 10 cm de longitud, la que se suelda a un cable conductor y se aísla igual que en el caso anterior. Luego la porción restante de cinta se limpia con  $\text{NO}_3\text{H}$  1:1 y se pulle con una tela limpia para después enrollarla en hélice, de tal manera que se forme un cilindro de unos 3 cm de longitud, recortando el extremo inferior de forma tal que quede plano.-

2.1.3.- Electrolito: Como electrolito se usa una solución de ácido acético 5M. acetato de sodio 0,5M. y acetato de plomo 0,1M. Se coloca en el interior del tubo hasta una altura superior en 1-2 cm del extremo del ánodo.-

2.1.4.- Armado del electrodo: El electrodo se arma según se vé en la figura III-1. Para evitar que partículas de plomo que se desprenden del ánodo caigan sobre el cátodo, provocando cortocircuitos y por lo tanto lecturas incorrectas, se coloca entre ambos electrodos un filtro contruido con tela de nylon. El electrodo completo se conecta a través de una resistencia variable a un registrador potenciométrico Honeywell Electronic 194.-

2.2.- Celda de reacción: La celda de reacción utilizada en la medida es de vi-

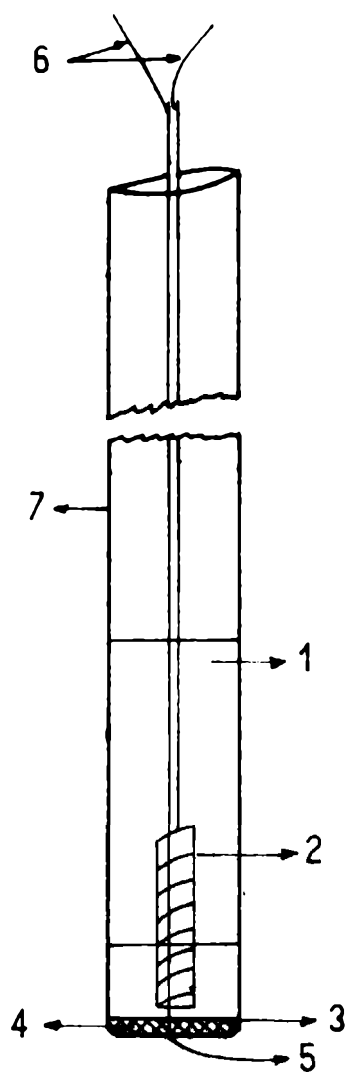


FIG. III-1: Diagrama del electrodo Plata-Plomo, mostrando la disposición de - sus partes. 1) electrolito; 2) ánodo de Plomo; 3) filtro; 4) cátodo de Plata; Membrana; 6) Conecciones al registrador; 7) tubo de vidrio.-



drio cerrada, con camisa de termostatación, debido a que el electrodo posee un alto coeficiente de temperatura (Johnson, M.J. et al. 1964/ 1967). Figura - III-2.-

La solución enzimática se agrega mediante una jeringa hipodérmica a la mezcla de reacción.-

### 2.3.- Comportamiento del electrodo en la determinación de la actividad enzimática.-

2.3.1.- Determinación del tiempo de respuesta: Para conocer el tiempo de respuesta, se colocó el electrodo -armado y conectado como se describió anteriormente- en agua saturada de aire y en una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (concentración de oxígeno tendiendo a cero), en forma alternada. La medida se realizó a 25°C con agitación magnética.-

2.3.2.- Evaluación de su respuesta en una reacción enzimática: Para evaluarla, se adicionó a un medio de reacción compuesto por 10 ml de buffer fosfato de pH 6,8; 0,1M y 1 ml de catecol 0,5M; 1 ml de solución enzimática obtenida a partir de polvos de acetona. La medida experimental se realiza en iguales condiciones que antes.-

2.3.3.- Respuesta frente a distintas cantidades de solución enzimática: Se mide la actividad de una solución de enzima en iguales condiciones que las descritas anteriormente, utilizando distintos volúmenes de la misma en cada determinación.-

## 3.- RESULTADOS.

3.1.- Determinación del tiempo de respuesta: Al medir la tensión generada por el electrodo en soluciones de sulfito de sodio saturada y en agua saturada de aire alternativamente, se obtuvieron gráficos del tipo mostrado en la figura -

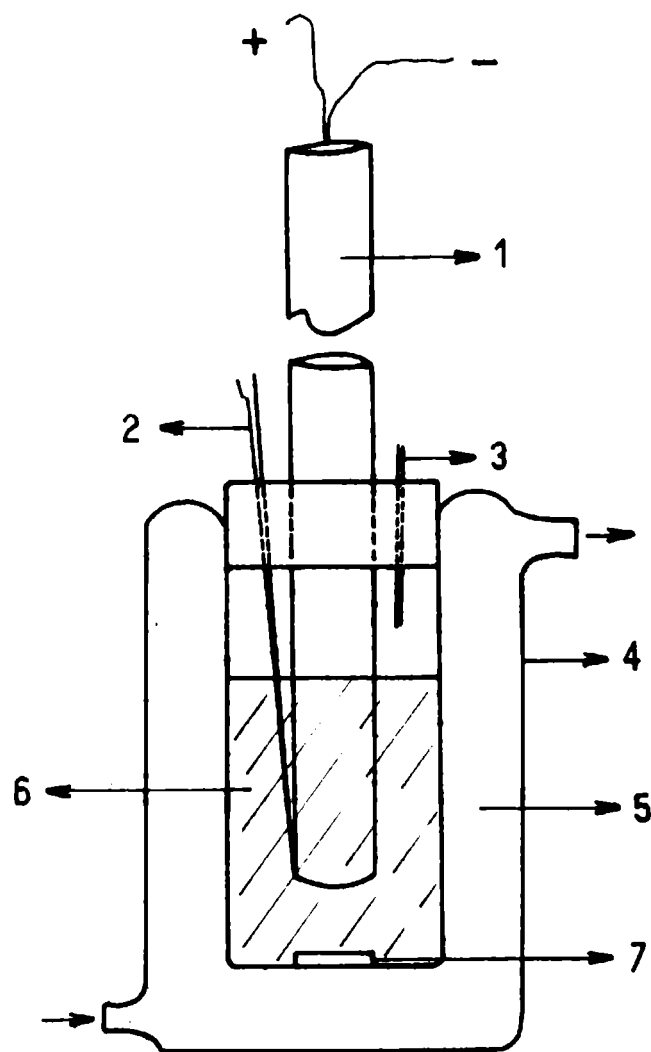


FIG. III-2: Diagrama de la celda de reacción. 1) electrodo; 2) Jeringa hipodérmica para adición sol. enz.; 3) Jeringa para equilibrar presiones; 4) celda de reacción; 5) Camiza de termostatzación; 6) medio de reacción; 7) buzo-magnét.-

### III-3.-

Los valores obtenidos en sucesivas experiencias (para un mismo electrodo) del tiempo necesario para el 90% de la respuesta,  $t_R$ , son:

$t_R$ (min)	$t_R$ (min)	$t_R$ (min)	$t_R$ (min)
2,00	1,00	3,00	1,40
0,70	1,75	1,10	1,00
0,50	0,50	2,50	0,30
1,00	1,40	0,30	1,75
2,00	0,00	0,70	0,50
		1,10	0,00

Luego, con estos valores calculamos los límites de confianza de la media aritmética, con el 95% de significación y 21 grados de libertad, mediante el siguiente cálculo:  $\mu = \bar{X} \pm t s_x$

donde:  $\mu$  = valor medio verdadero.-

$\bar{X}$  = valor medio estimado,  $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$  con N = Número de determinaciones.-

$s_x$  = error típico de la media,  $s_x = \frac{s}{\sqrt{N}}$  con s = desviación típica.-

t = estadístico de Student.-

Se obtienen los siguientes resultados para el tiempo correspondiente al 90% de la respuesta total:

$$u = 1,02 \pm 2,08 \times 0,17 \text{ min}$$

$$u = 1,02 \pm 0,35 \text{ min}$$

3.2.- Evaluación de la respuesta en una reacción enzimática: Al medir la respuesta del electrodo en presencia del medio de reacción mencionado anteriormente y de solución enzimática, se obtuvieron gráficos como el que se muestra en la figura III-4, del cual vemos que se puede evaluar la velocidad de reacción-

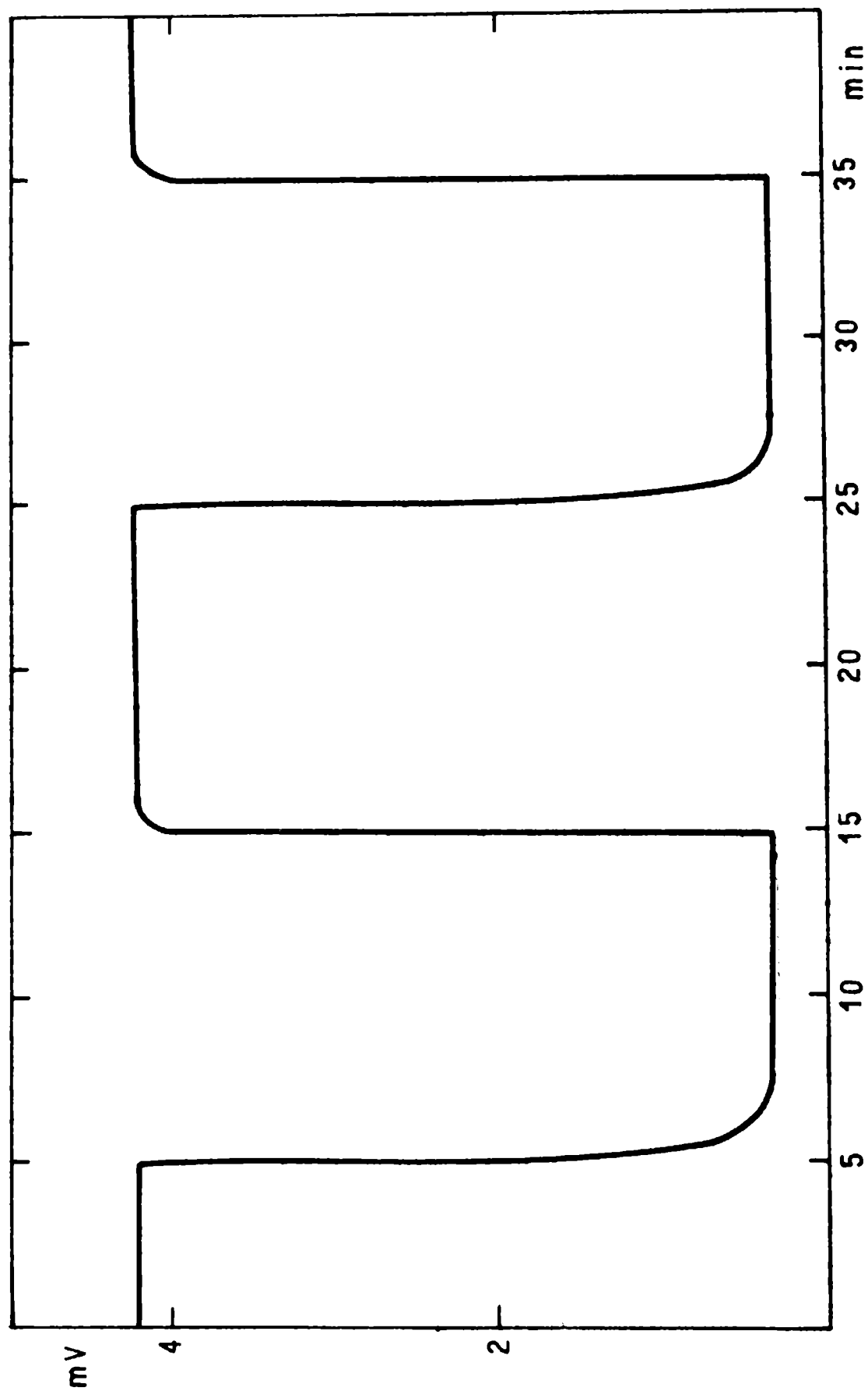


FIG. III-3

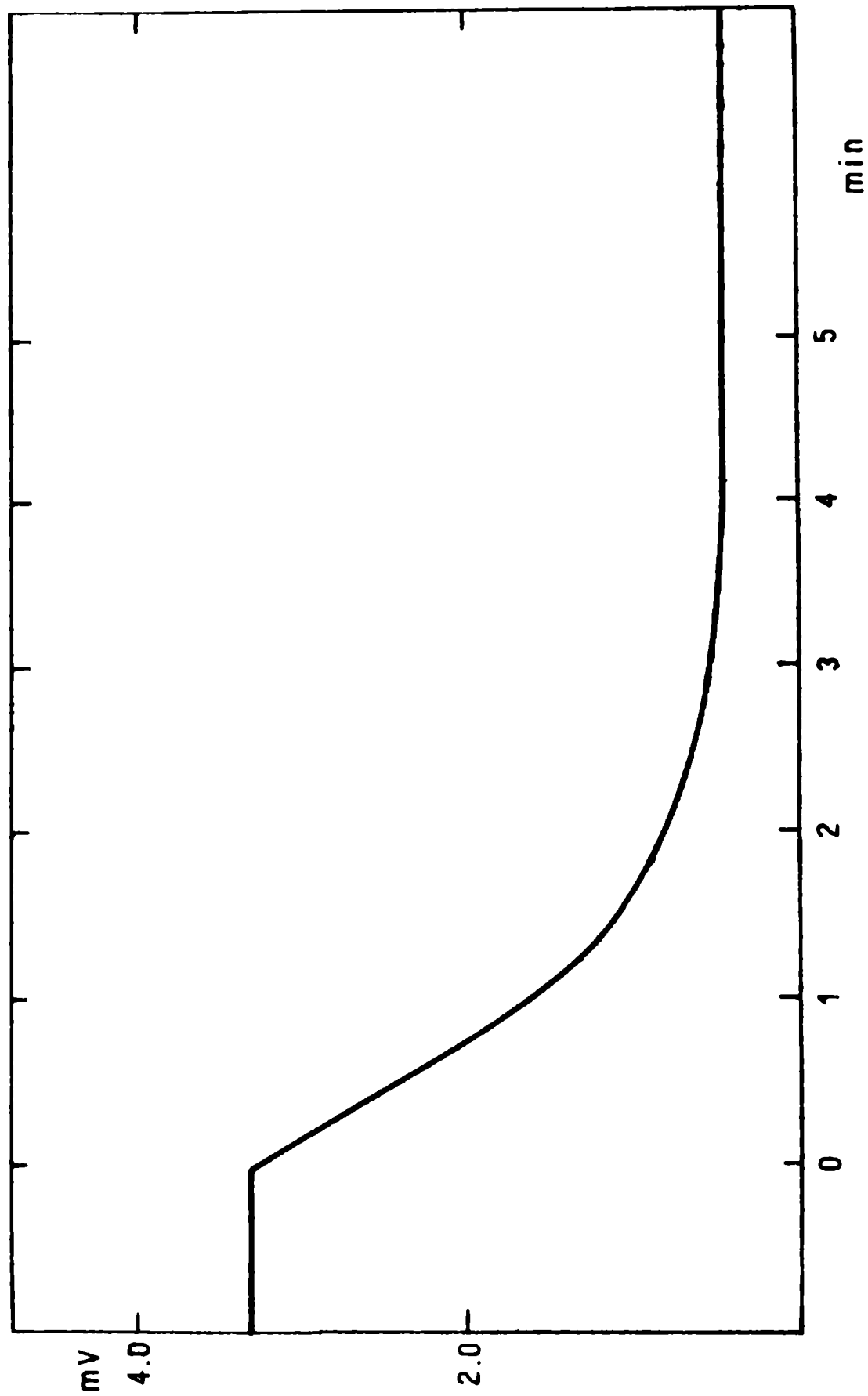


FIG. III-4

inicial.-

3.3.- Respuesta frente a distintas cantidades de solución enzimática: Se obtuvo una relación lineal entre la tensión de respuesta y la concentración de la enzima presente, la que se exhibe en la figura III-5.-

3.4.- Cálculo de la precisión del método: Para calcular la precisión del método se hizo uso de los valores hallados durante la sumersión alternativa en solución saturada de sulfito de sodio y agua saturada de aire. Ellos son:

mV en agua saturada de aire.	mV en sol. saturada de $\text{Na}_2\text{SO}_3$
4,20	0,60
4,00	0,20
4,20	0,20
4,20	0,55
3,95	0,65
3,80	0,70
3,75	
3,70	
3,95	

Aplicando el tratamiento estadístico descripto anteriormente se obtuvo:

a) para agua saturada de aire

$\mu = 3,98 \pm 0,16$  mV                      con  $t = 2,31$  para 95% de confianza y 8 grados de libertad y  $s = 0,20$  mV.-

b) para solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  saturada

$\mu = 0,51 \pm 0,19$  mV                      con  $t = 2,38$  para 95% de confianza y 5 grados de libertad y  $s = 0,21$  mV.-

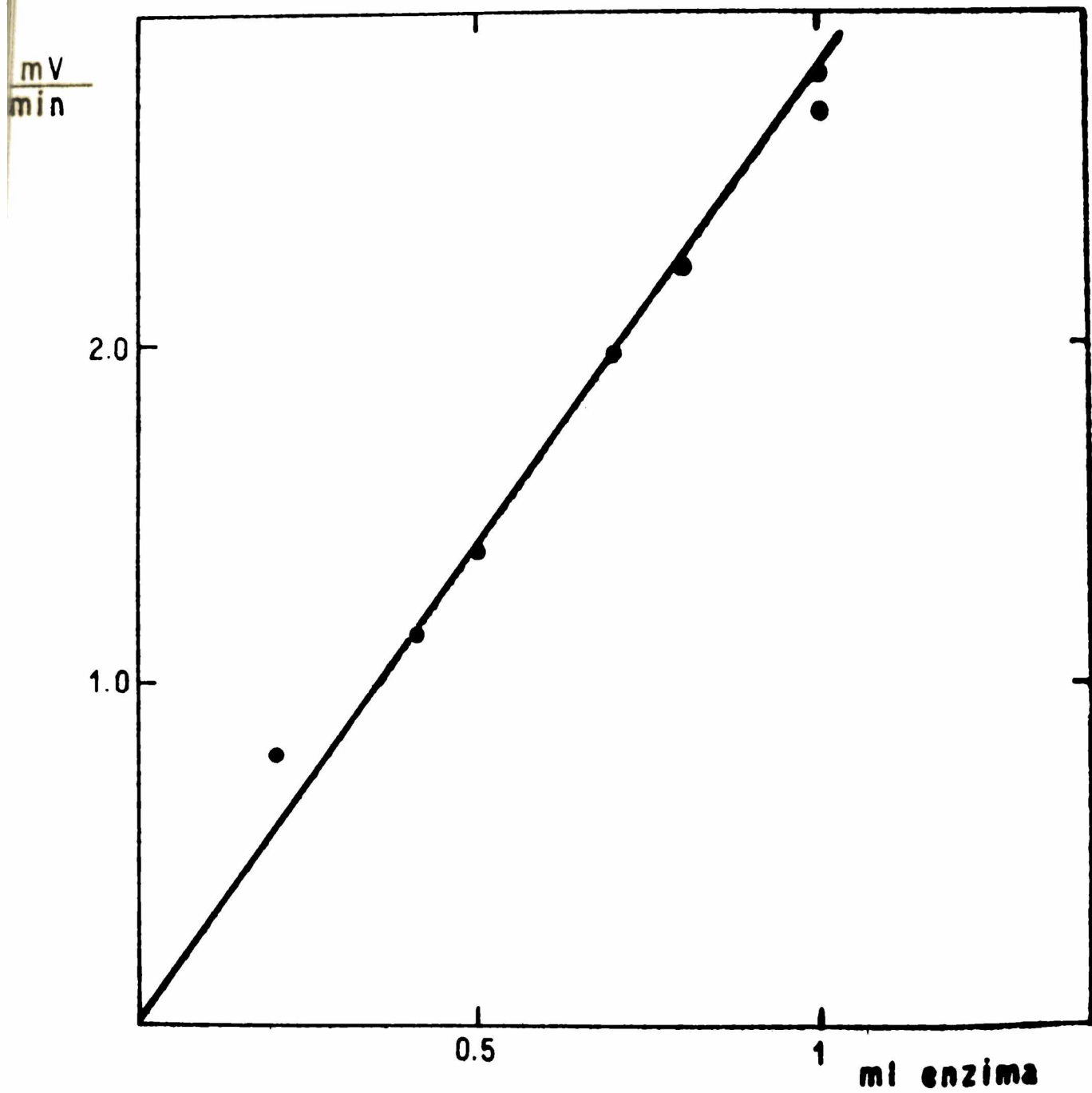


FIG. III-5

Lo mismo se hizo en una reacción enzimática, trabajando siempre con la misma solución de enzima y en igual cantidad. Los valores hallados en unidades arbitrarias son: 8,60; 8,70; 8,55; 8,45 y 8,50.-

Luego, con el mismo nivel de confianza anterior y 4 grados de libertad, el valor de  $t$  es 2,78. El  $s$  calculado es 0,09 mV. Por lo tanto:

$$\mu = 8,56 \pm 0,11 \text{ mV}$$

#### 4.- DISCUSION:

El electrodo, elegido de fácil construcción, fue diseñado originalmente por Johnson et al. 1964, para ser usado en fermentadores biológicos. Por ello ha sido necesario verificar su idoneidad para seguir una reacción enzimática. Luego, interesaba conocer el tiempo de respuesta, la precisión del método, si era utilizable en pequeños volúmenes de líquido y en fin, si permitía medir la velocidad de reacción inicial.-

Para conocer el tiempo de respuesta se colocó el electrodo alternativamente en agua saturada de aire y en solución saturada de sulfito de sodio.-

Con los datos hallados se calculó una confianza del 95% que el tiempo necesario para el 90% de la respuesta total es de  $1,0 \pm 0,3$  minutos. Del gráfico III-3 y los valores dados puede verse que la tensión en ausencia de oxígeno es pequeña.-

Una vez calculado el tiempo de respuesta se ensayó el electrodo en reacciones enzimáticas, comprobándose que es idóneo para calcular la velocidad de reacción inicial, como puede verse en la figura III-4. Por otra parte, se halló que la velocidad de reacción crece linealmente con el aumento de la concentración de la enzima, como se ve en el gráfico III-5.-

A partir de los valores encontrados en distintas evaluaciones de la actividad enzimática para un mismo electrodo y una misma solución enzimática, se halló -



con una confianza del 95% que la precisión del método es de  $\pm 0,1$  mV.-

Luego, concluimos que el electrodo de membrana de Ag - Pb permite medir la velocidad de reacción inicial en la oxidación enzimática de o-difenoles, que la misma crece linealmente con la concentración de la enzima y que la precisión del método es de 0,1 mV, siendo el tiempo de respuesta para el 90% del total de 1 minuto.-

#### IV.- EFFECTOS DEL DIOXIDO DE CARBONO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOL OXIDASA DE MANZANAS.

##### 1.- INTRODUCCION:

Siendo la presencia de anhídrido carbónico una de las características principales del almacenamiento en atmósfera controlada, se estudió su efecto sobre algunos aspectos del metabolismo de las frutas.-

Las observaciones antes anotadas, -prolongación de la vida de almacenamiento- de los frutos, mayor acidez, retención de firmeza, menor incidencia de daños fisiológicos, etc.- conjuntamente con el hecho que a altas concentraciones de dióxido de carbono, se produce la acumulación de ácido succínico, el que disminuye la respiración del tejido hasta anularla, provocando luego, su muerte - y posterior pardeamiento (Hulme, A.C. 1956), llevaron a pensar que algún proceso oxidativo de la cadena respiratoria era inhibido por la presencia de dióxido de carbono en la atmósfera (Thomas, M. 1925).-

Por ello, Ranson, S.L.; Walker, D.A. y Clarke, I.D. (1957/1960) estudiaron la inhibición de la succínicooxidasa por el anhídrido carbónico, incubando preparaciones mitocondriales de ricino, en soluciones de  $\text{CO}_2\text{-NaHCO}_3$ . Smith, H. - - (1957) halla que en grosellas almacenadas en altas concentraciones de gas carbónico, se produce una acumulación de alcohol etílico y acetaldehído.-

A pesar de lo anteriormente dicho, se han realizado pocos estudios sobre sistemas enzimáticos particulares.-

La primera demostración directa de la inhibición de una enzima por el dióxido de carbono de la atmósfera fue obtenida por Walker, D.A. y Brown, J.M.A. (1957) quienes trabajaron sobre fosfoenol pirúvico carboxilasa, hallando que la inhibición es de tipo no competitivo.-

Bendall, D.S.; Ranson, S.L. y Walker, D.A. (1958/1960) investigan su efecto -

sobre las enzimas mitocondriales del ricino involucradas en la producción y consumo del succinato, estableciendo que el punto de inhibición es la succinato deshidrogenasa, siendo en este caso la inhibición de tipo competitivo.-

Por otra parte, Miller, G.W y Evans, H.J. (1956) estudian el efecto del bicarbonato de sodio sobre la actividad de la citocromo oxidasa, hallando que también es inhibida en forma competitiva.-

La observación, ya señalada anteriormente, de la menor frecuencia de aparición del pardeamiento de la pulpa y corazón de los productos almacenados en atmósfera controlada llevó a pensar que, la enzima responsable del mismo -la polifenoloxidas- es inhibida por el dióxido de carbono atmosférico. Por ello se decidió investigar este efecto. Así se midió la actividad de dicha enzima en presencia de distintas concentraciones de anhídrido carbónico, trabajando con extractos enzimáticos crudos y soluciones purificadas, a distintas temperaturas.-

## 2.- MATERIALES Y METODOS.

### 2.1.- Solución enzimática purificada:

La polifenoloxidasa parcialmente purificada se obtuvo a partir de manzanas Red Delicious adquiridas en el comercio local, como se describe en el capítulo II.-

### 2.2.- Solución enzimática cruda:

Se preparó triturando el tejido del mismo fruto en presencia de buffer fosfato 0,1M; pH 6,5.-

### 2.3.- Determinación de la actividad:

La actividad enzimática se determinó en buffer fosfato pH 6,8 utilizando el -

electrodo de oxígeno descripto en el capítulo anterior, con catecol 0,045M como sustrato y la cantidad correspondiente de la mezcla de bicarbonato-dióxido de carbono, necesaria para dar 0, 5, 10, 20 y 30% de dióxido de carbono a la temperatura estipulada. No es necesario equilibrar la mezcla de reacción final con una atmósfera conteniendo la cantidad apropiada de  $\text{CO}_2$ , ya que en el corto período de reacción de la medida experimental, el error resultante por la difusión del dióxido de carbono es despreciable, según se determinó experimentalmente. La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una variación de 0,1 mV por minuto al comienzo de la reacción.-

#### 2.4.- Regulación de la concentración de dióxido de carbono:

Las concentraciones de dióxido de carbono atmosféricas se simularon utilizando mezclas de bicarbonato-dióxido de carbono (Ranson, S.L. et al. 1960; Bendall, D.S. et al. 1960). Las concentraciones molares de las soluciones de bicarbonato correspondientes a los distintos % de  $\text{CO}_2$ , se calcularon con la ecuación - de Henderson - Hasselbach, (Umbreit, W.W. et al. 1949).-

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{CO}_3\text{H}^-) - \log \frac{\alpha \cdot \text{P} \cdot \% \text{CO}_2}{760 \times 2240}$$

donde: pH es el pH deseado.-

pK = - log K; (K = constante de equilibrio para la primera disociación del  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ).-

P = presión atmosférica en mm de Hg.-

$\alpha$  = solubilidad del  $\text{CO}_2$ .-

% $\text{CO}_2$  = porcentaje de  $\text{CO}_2$  del gas en equilibrio a la presión atmosférica.-

Para el cálculo se toma  $P = 760$  mm Hg y  $pH = 6,8$ .-

De esta manera preparamos una solución de  $HCO_3^-$  de molaridad correspondiente a una concentración en equilibrio de  $CO_2$  igual al 50%, la que se estabiliza mediante el pasaje de una mezcla gaseosa conteniendo 50% de  $CO_2$  y 50% de aire. Las mezclas gaseosas se preparan por un método dinámico (Nelson, G.O. 1973),- según puede verse en el diagrama correspondiente (Fig. IV-1).-

El caudal de los gases se regulariza según:

$$C_{CO_2} = \frac{100 \cdot F_{CO_2}}{F_{aire} + F_{CO_2}} \qquad F_a = \frac{F_{CO_2} (100 - C_{CO_2})}{C_{CO_2}}$$

donde:  $C_{CO_2}$  = conc. %  $CO_2$ .-

$F$  = flujos.-

Esta solución se adiciona a la mezcla de reacción a fin de obtener las concentraciones de  $HCO_3^-$  necesarias para dar 5, 10, 20 y 30% de  $CO_2$ .-

## 2.5.- Regulación de la temperatura:

Se determinó la actividad enzimática a 0, 5, 10, 20 y 25°C, en las condiciones antes establecidas. Para lograr las bajas temperaturas se utilizó como líquido de termostatización alcohol proveniente de un criostato, mientras que para las temperaturas mayores se usó un termostato convencional, con circulación externa. La energía de activación se calculó mediante la ecuación de Arrhenius.-

## 2.6.- Estudio del tipo de inhibición:

A fin de establecer el tipo de inhibición, se midió la actividad enzimática, para ambos extractos, a distintas concentraciones de sustrato. Con los datos-

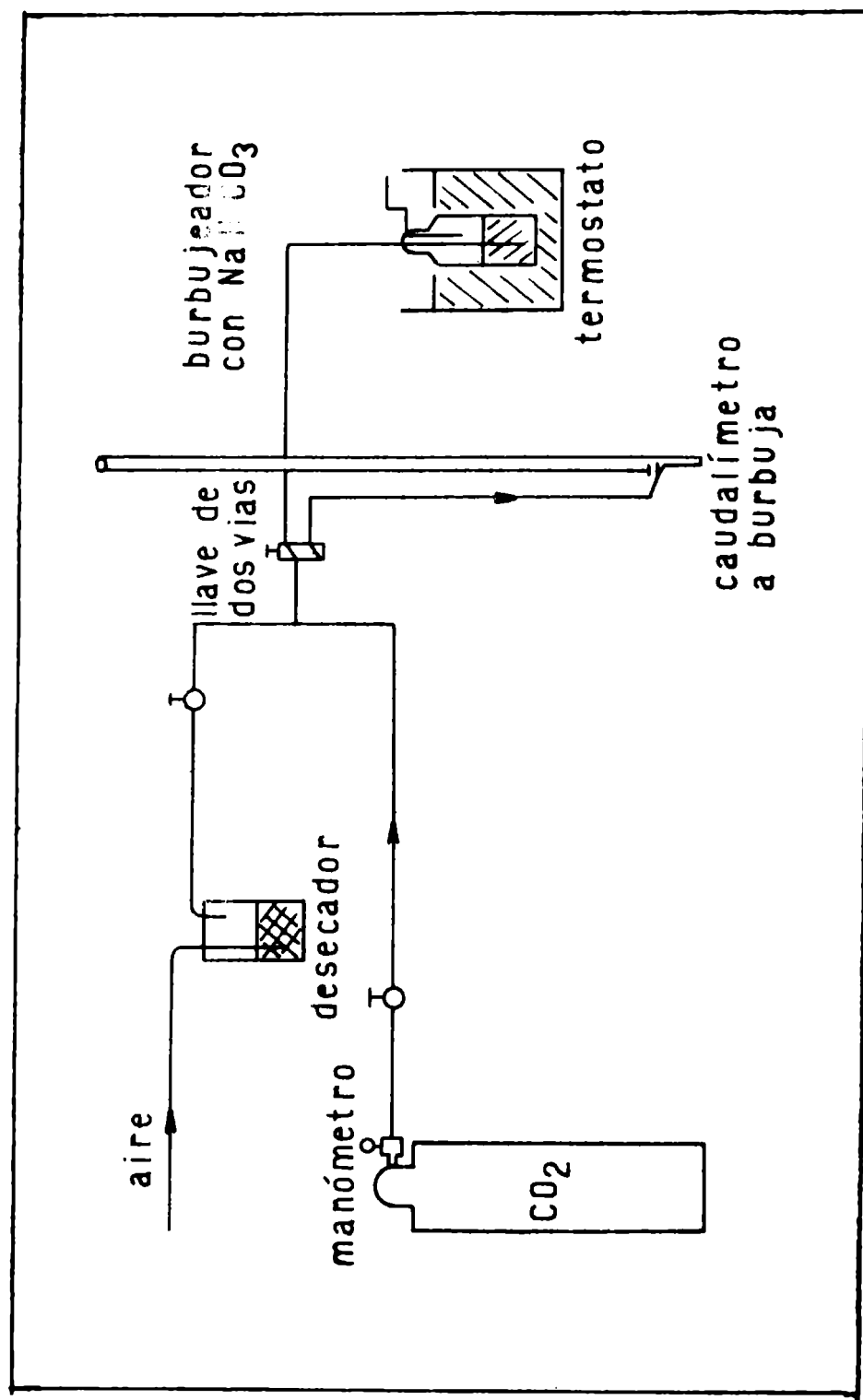


FIG. IV-1

obtenidos se trazaron los gráficos de Linweaver - Burk, de Dixon y los de Cornish-Bowden, como así también las pendientes de los gráficos nombrados en primer término versus la concentración de inhibidor.-

Las líneas rectas se ajustaron en todos los casos mediante el método de mínimos cuadrados.-

### 3.- RESULTADOS.

#### 3.1.- Regulación de la concentración de $\text{CO}_2$ :

Las concentraciones molares de las soluciones de  $\text{HCO}_3^-$  correspondientes a los distintos porcentajes de  $\text{CO}_2$  y diferentes temperaturas son:

% $\text{CO}_2$					
T(°C)	5	10	20	30	50
0	$6,54 \times 10^{-3}$	$1,31 \times 10^{-2}$	$2,62 \times 10^{-2}$	$3,92 \times 10^{-2}$	$6,54 \times 10^{-2}$
5	$6,10 \times 10^{-3}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$2,44 \times 10^{-2}$	$3,66 \times 10^{-2}$	$6,11 \times 10^{-2}$
10	$5,74 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-2}$	$2,29 \times 10^{-2}$	$3,44 \times 10^{-2}$	$5,74 \times 10^{-2}$
15	$5,25 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-2}$	$2,10 \times 10^{-2}$	$3,15 \times 10^{-2}$	$5,25 \times 10^{-2}$
20	$4,84 \times 10^{-3}$	$9,69 \times 10^{-3}$	$1,94 \times 10^{-2}$	$2,91 \times 10^{-2}$	$4,84 \times 10^{-2}$
25	$4,44 \times 10^{-3}$	$8,87 \times 10^{-3}$	$1,77 \times 10^{-2}$	$2,66 \times 10^{-2}$	$4,44 \times 10^{-2}$

#### 3.2.- Efectos del $\text{CO}_2$ :

Un cuadro típico mostrando los efectos de las distintas concentraciones de  $\text{CO}_2$  sobre la actividad catecolasa, a temperatura constante (15°C) es el si -

guiente:

<u>% CO<sub>2</sub></u>	<u>act. (u/ml)</u>
0	11,17
5	10,00
10	7,50
20	5,00
30	4,65

para pH = 6,8 y una concentración de catecol igual a 0,045M.-

Este cuadro se representa en la figura IV-2 (línea llena). En ella podemos ver que la actividad de la enzima disminuye con el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>.-

A 20°C, con un 30% de CO<sub>2</sub>, la inhibición es aproximadamente del 70%. (Los datos correspondientes a otras temperaturas y concentración de sustrato, se muestran en el apéndice 1).-

Habiendo hallado que la presencia de CO<sub>2</sub> disminuye la actividad de la enzima, nos interesó conocer el tipo de inhibición que se producía. Para ello se midió la velocidad de reacción inicial,  $v$ , a distintas concentraciones del sustrato (catecol), para diferentes concentraciones de inhibidor y se trazaron los gráficos de Lineweaver-Burk (figura IV-3), obteniéndose en todos los casos líneas rectas que se cortan a la izquierda del eje  $1/v$ , lo que hace suponer que la inhibición es del tipo mixto.-

Sin embargo, al dibujar los gráficos que representan la inversa de la velocidad inicial de reacción frente a la concentración del inhibidor  $i$  (Dixon-1958) y los de  $s/v$  frente a  $i$  (Cornish-Bowden, et al. 1974) (figuras IV-4 y 5), a distintas concentraciones del sustrato,  $s$ , se obtienen en el primer caso líneas rectas que se cortan, también, a la izquierda del eje  $1/v$ , mientras que -



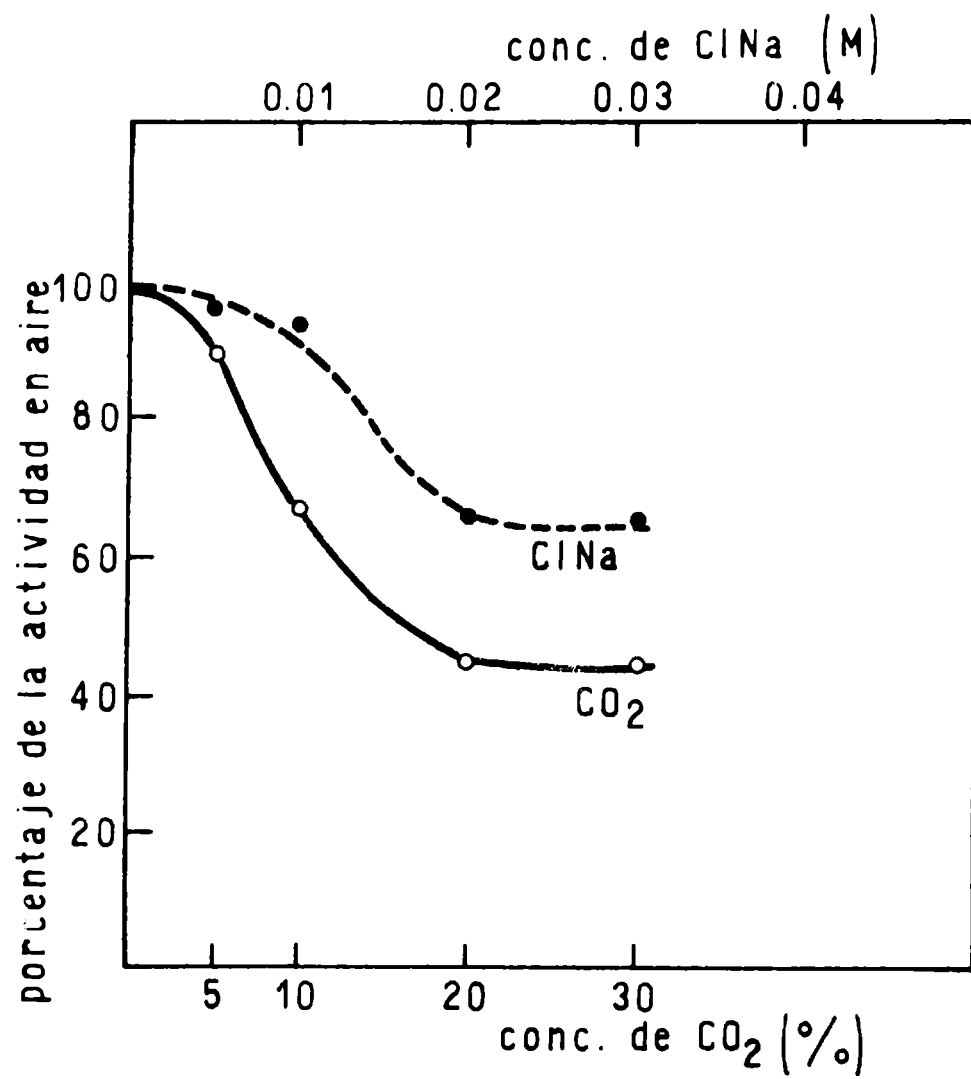
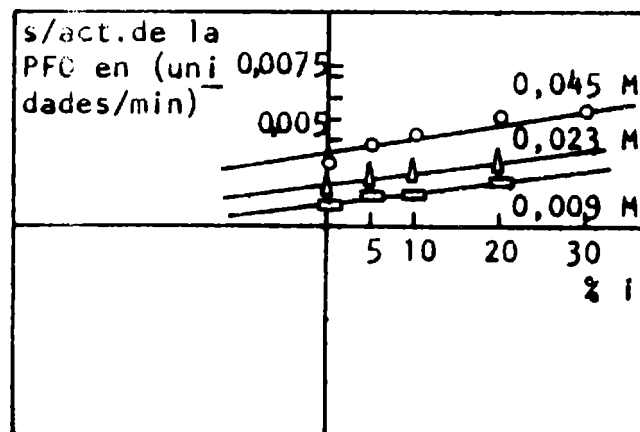
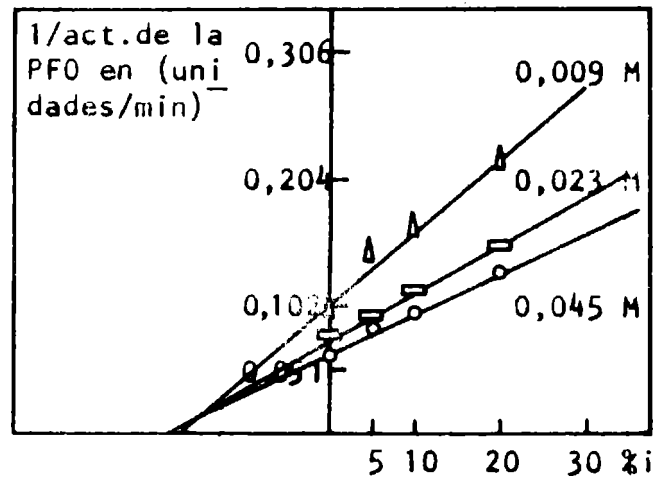
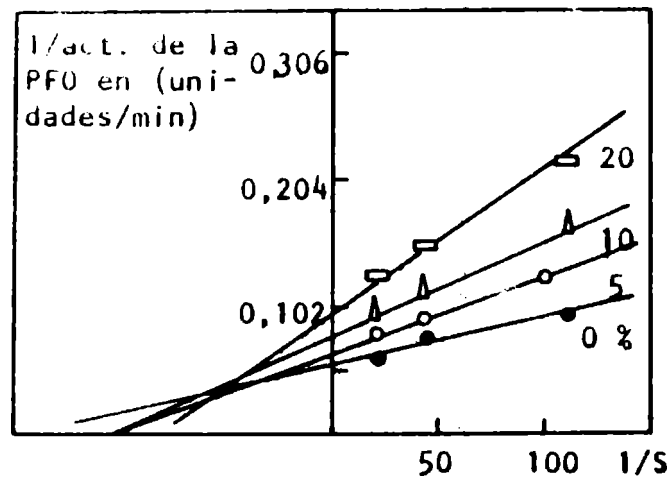


FIG. IV-2



FIGS. IV-3; 4 y 5

los segundos dan rectas paralelas. Del conjunto de estos gráficos se puede inferir que la inhibición es de tipo competitivo.-

También al representar las pendientes del gráfico de Linweaver-Burk versus la concentración del inhibidor se forman rectas, lo que confirma que la inhibición es de tipo competitivo.-

Los extractos crudos se comportan igual que las soluciones enzimáticas purificadas, respecto al tipo de inhibición (figuras IV-6 a 8).-

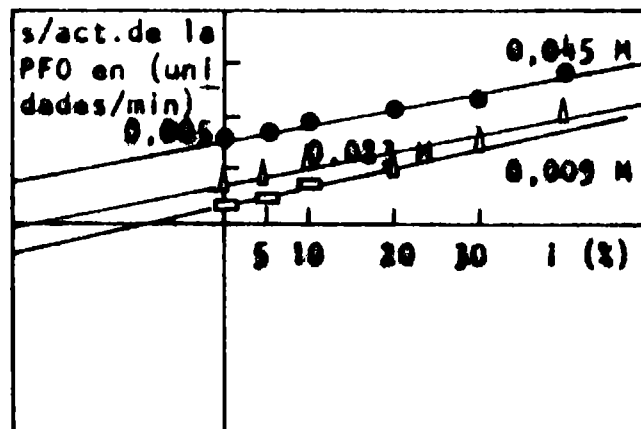
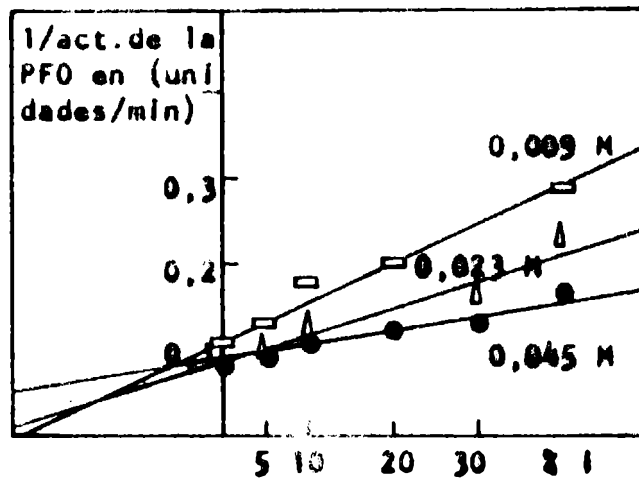
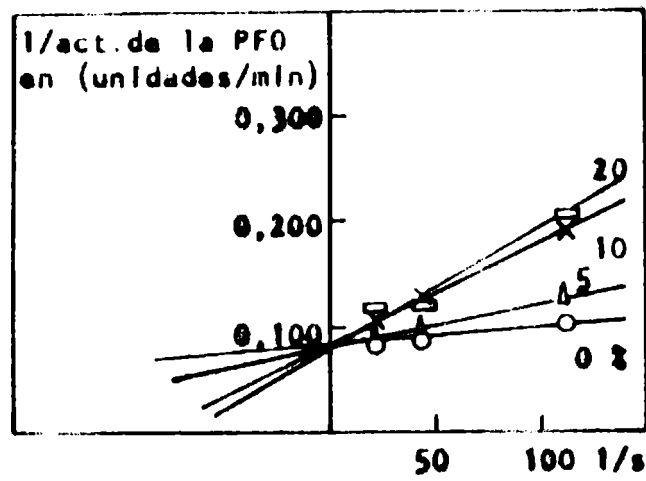
Para comprobar la reversibilidad de la inhibición se procedió a preparar los extractos enzimáticos crudos, uno en la forma habitual y otro en presencia de dióxido de carbono-bicarbonato de sodio, para dar una mezcla en equilibrio con el 50% de dióxido de carbono. Se mantuvieron ambos extractos durante una hora en ambiente refrigerado. Si la combinación del dióxido de carbono o el bicarbonato con la enzima fuera irreversible, la actividad en el extracto que se preparó en presencia de anhídrido carbónico sería marcadamente menor que la del otro extracto, lo que no ocurre, pues la actividad medida en la preparación tratada con el inhibidor es igual a la actividad de la muestra preparada en la forma habitual.-

### 3.3.- Efectos de la temperatura:

A concentración constante de dióxido de carbono la actividad aumenta con la temperatura, lo mismo que la inhibición (figuras IV-9 y 10).-

A bajas temperaturas, la actividad enzimática es pequeña, y la influencia del inhibidor no es tan notoria, sobre todo a bajas concentraciones, lo que se traduce en un aumento de la dispersión de datos, llegando a ser las diferencias entre las distintas actividades a diferentes concentraciones de dióxido de carbono inferior al error experimental.-

Con los valores de la actividad a diferentes temperaturas y concentración de-



FIGS. IV-6; 7 y 8

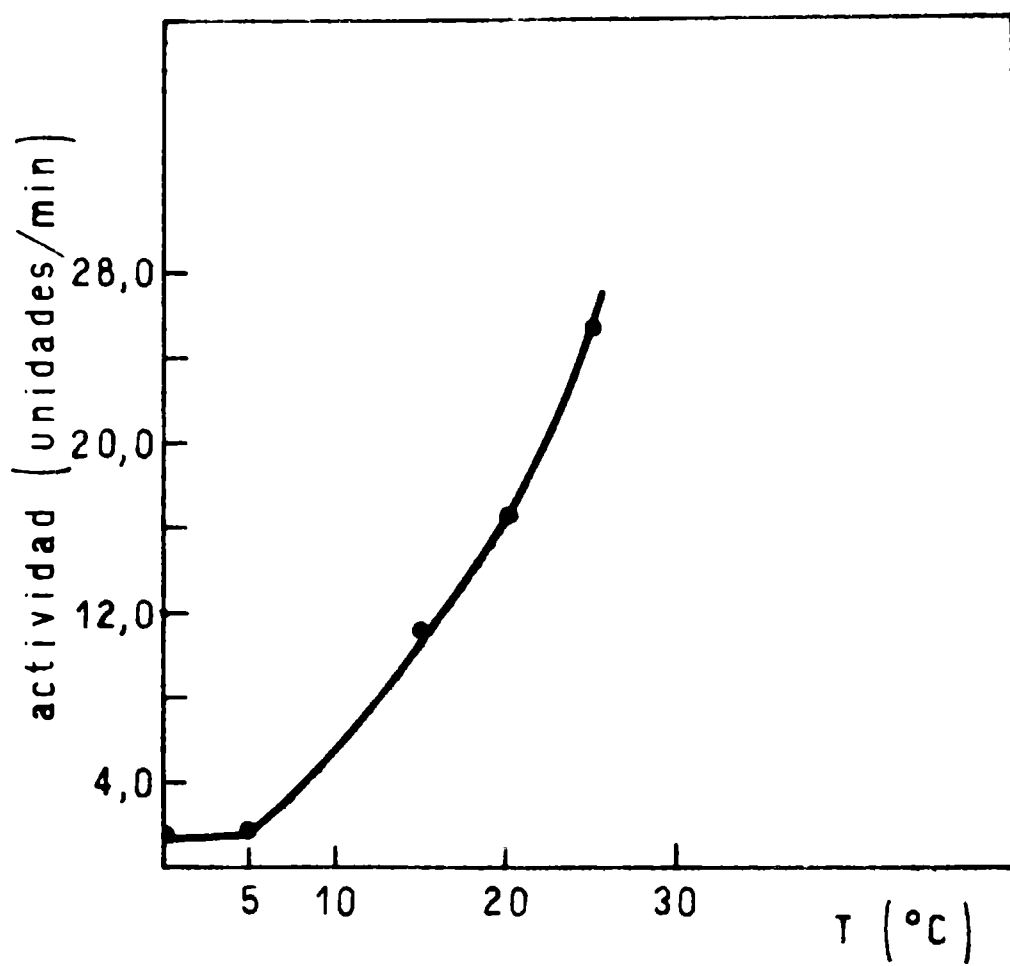


FIG. IV-9

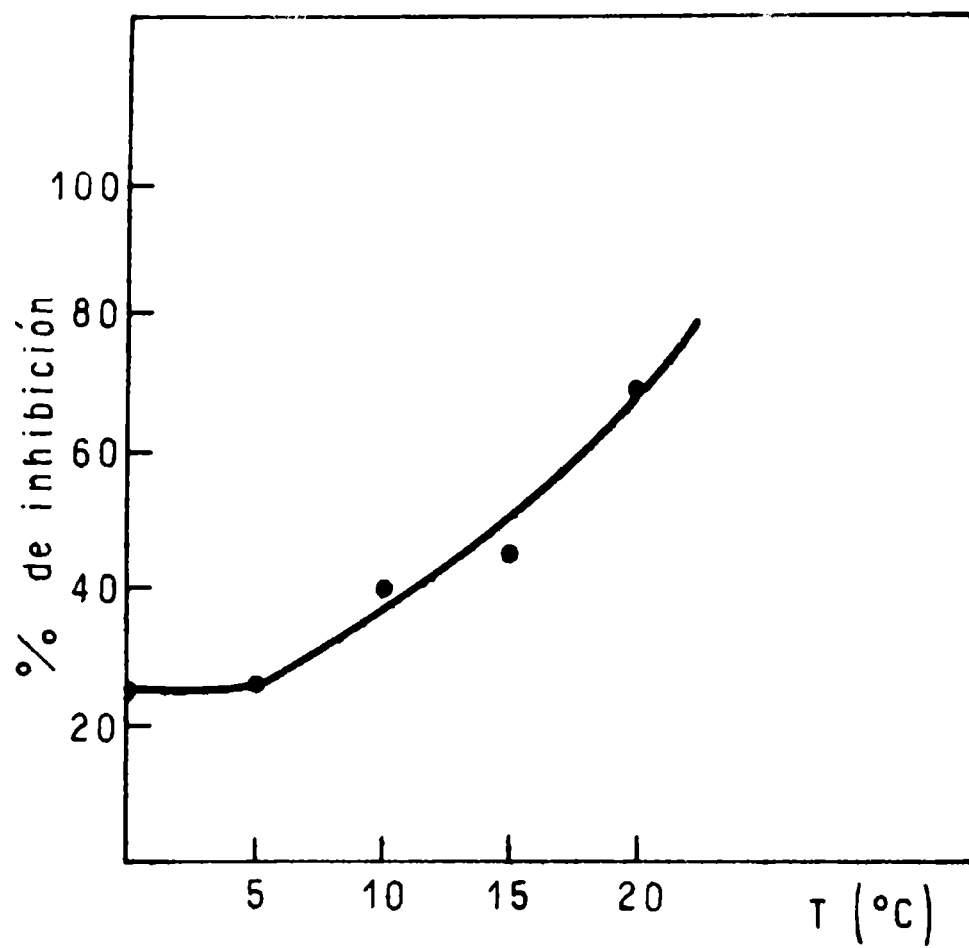


FIG. IV-10

inhibidor constante, se calcularon las energías de activación. Representando el logaritmo de la velocidad de reacción inicial, versus la inversa de las temperaturas absolutas (figura IV-11), se encuentra que existe una relación lineal. La energía de activación se determinó utilizando la ecuación de Arrhenius

$$-\frac{dc}{dt} = A e^{-E/RT}$$

obteniéndose el valor de 22,09 Kcal/mol para la solución enzimática purificada y 17,59 Kcal/mol para los extractos crudos, en todas las concentraciones de anhídrido carbónico ensayadas.-

#### 3.4.- Efectos del cloruro de sodio:

Para examinar la especificidad de la inhibición ocasionadas por las mezclas de bicarbonato-dióxido de carbono, se investigó el efecto de iguales concentraciones de NaCl sobre el sistema polifenoloxidasas, comprobándose que también produce inhibición, pero en menor grado que el dióxido de carbono.-

La comparación de los efectos a 15°C se representa en la figura IV-2.

Una pauta análoga se presenta en las restantes temperaturas, tanto en soluciones purificadas como en extractos crudos (Los valores correspondientes se muestran en el apéndice 1).-

A baja temperatura las diferencias en la inhibición son pequeñas .-

#### 4.- DISCUSION.

La inhibición del sistema polifenoloxidasas de manzana Red Delicious por el dióxido de carbono es ya considerable a concentraciones del mismo menores al 20%. A 15°C, con un 15% de dióxido de carbono, se obtiene el 50% de inhibición, según puede observarse en la figura IV-2.-

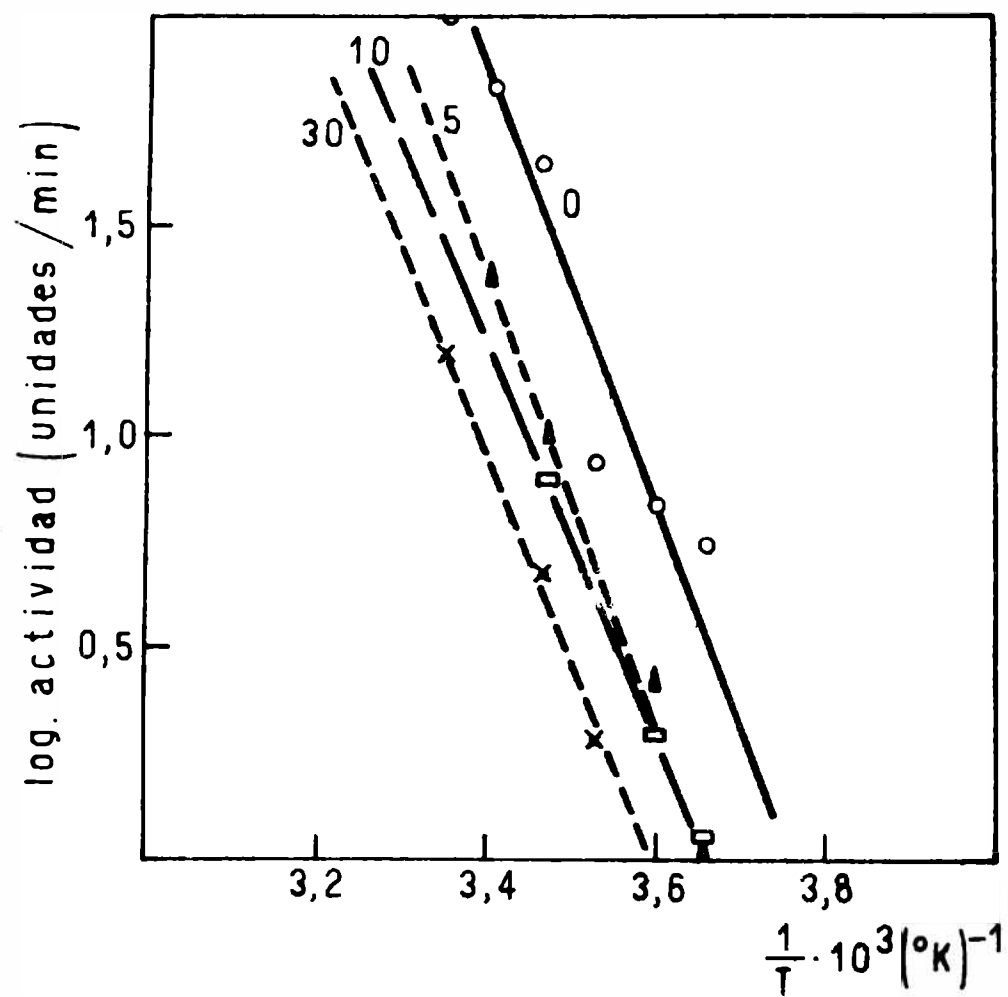


FIG. IV-11



Al considerar los gráficos de Linweaver-Burk (figura IV-3), podría pensarse que, por cortarse las rectas a la izquierda del eje de ordenadas y no sobre él, la inhibición es de tipo mixto. De ser así, debería obtenerse, al representar  $1/v$  versus la concentración del inhibidor, líneas curvas, cosa que no sucede y no líneas rectas que se cortaran a la izquierda de  $1/v$  (Cornish-Bowden, 1974) lo cual es el caso (figura IV-4).-

Al no poder, por lo tanto, discernir si la inhibición es de tipo competitivo o mixto, se trazaron los gráficos de Cornish-Bowden, que al decir del autor complementan a los de Dixon, y sí permiten diferenciar estos dos tipos de inhibición. Si la inhibición fuera de tipo mixto se obtendrían rectas que se cortan a la izquierda del eje de ordenadas, pero por un punto por debajo del eje  $i$ . Si fuera de tipo competitivo, las rectas serían paralelas ya que no se forma el complejo ternario enzima-inhibidor-sustrato. Esto último es lo que sucede en nuestro caso (figura IV-5).-

También confirma que el tipo de inhibición es competitiva la existencia de una relación lineal entre las pendientes e intersecciones con el eje de ordenadas del gráfico de las dobles recíprocas y la concentración del inhibidor. Los extractos crudos presentan igual comportamiento que las soluciones enzimáticas purificadas, en todos los casos.-

La naturaleza competitiva de la inhibición y el menor efecto que produce el NaCl, en concentraciones equivalentes sobre el sistema, lleva a pensar que la inhibición es un efecto específico del dióxido de carbono.-

El aumento de la temperatura actúa elevando el porcentaje de inhibición para un mismo contenido de dióxido de carbono, o sea que facilita la formación del complejo enzima-inhibidor.-

Los valores hallados para la energía de activación son aproximadamente cinco veces mayores que los encontrados en la literatura (Ingraham, 1954; Tate-Luh,-

1964).-

Por lo tanto, se concluye que una de las causas de la menor incidencia del pardeamiento en frutos almacenados en atmósfera controlada, podría ser la inhibición del sistema polifenoloxidasa por el  $\text{CO}_2$  de la atmósfera, conjuntamente - con la disminución de la temperatura.-

V.- ALMACENAMIENTO DE MANZANAS GRANNY SMITH.- EFECTO DE LA COMPOSICION DE LA-  
ATMOSFERA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA.-

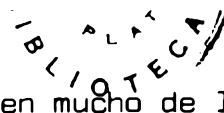
1.- INTRODUCCION:

En los capítulos anteriores hemos estudiado el efecto del anhídrido carbónico sobre la enzima polifenoloxidasas de manzanas "in vitro". Nos interesa, llegado este punto, investigar la influencia del mismo compuesto sobre dicha enzima "in vivo", o sea en la fruta almacenada en presencia de distintas concentraciones de dióxido de carbono.-

Así, no sólo veremos la influencia del  $\text{CO}_2$ , sino también, qué es lo que sucede a través del tiempo de almacenamiento, en sus diversas condiciones (atmósfera controlada y almacenamiento refrigerado normal).-

Poco hemos hallado en la bibliografía respecto a la variación de la actividad catecolasa con el tiempo de almacenamiento. Samorodova-Bianki, G.B. et al. (1971), hallaron que esta enzima se degrada a través del tiempo, pasando de un octámero a monómero, aumentando a la vez su actividad total, trabajando en manzanas Antonovka obyknovennaya y Leningradskaya zelenka, almacenadas en aire y temperatura baja positiva. Versiones un tanto contradictorias se han encontrado respecto a lo que ocurre con la actividad polifenol oxidasa en papas almacenadas. Así Bierecki, M. et al. (1971), halla que la actividad de la misma aumenta a través del tiempo de almacenamiento en cinco variedades de papas; Mondy et al (1960) por su parte demuestran que la actividad fenolasa en tubérculos de las variedades Pontiac y Ontario disminuye marcadamente durante las primeras cuatro semanas de almacenamiento a  $40^\circ \text{F}$  y permanece relativamente baja y estacionaria después; Cheung y Henderson, sin embargo, hallan que la misma actividad enzimática disminuye lentamente durante todo el período de almacenamiento, haciéndolo con mayor velocidad entre el 4º y 6º mes del mismo

en papas Netted Gem y Pontiac.-



Es evidente que los resultados dependen en mucho de la variedad así como de las condiciones de cultivo y almacenamiento y de los métodos de extracción de la enzima, ya que como Harel y Mayer (1968) demostraron trabajando con manzanas Grand Alexander las soluciones de polifenoloxidasas almacenadas por varios días entre 2-4°C sufren transformaciones en cuanto a su peso molecular y actividad. Lo mismo se ha hallado que ocurre durante la incubación a 5-25°C de la catecoloxidasas de neurospora (Fox, A.S. et al 1962).-

## 2.- MATERIALES Y METODOS.

### 2.1.- Frutos - Variedad - Procedencia:

Para este ensayo se utilizaron manzanas de la variedad Granny Smith procedentes de una isla de Río Negro, cerca de Guardia Mitre. Los frutos fueron previamente clasificados por tamaño en lugar de origen.-

### 2.2.- Cámaras frigoríficas:

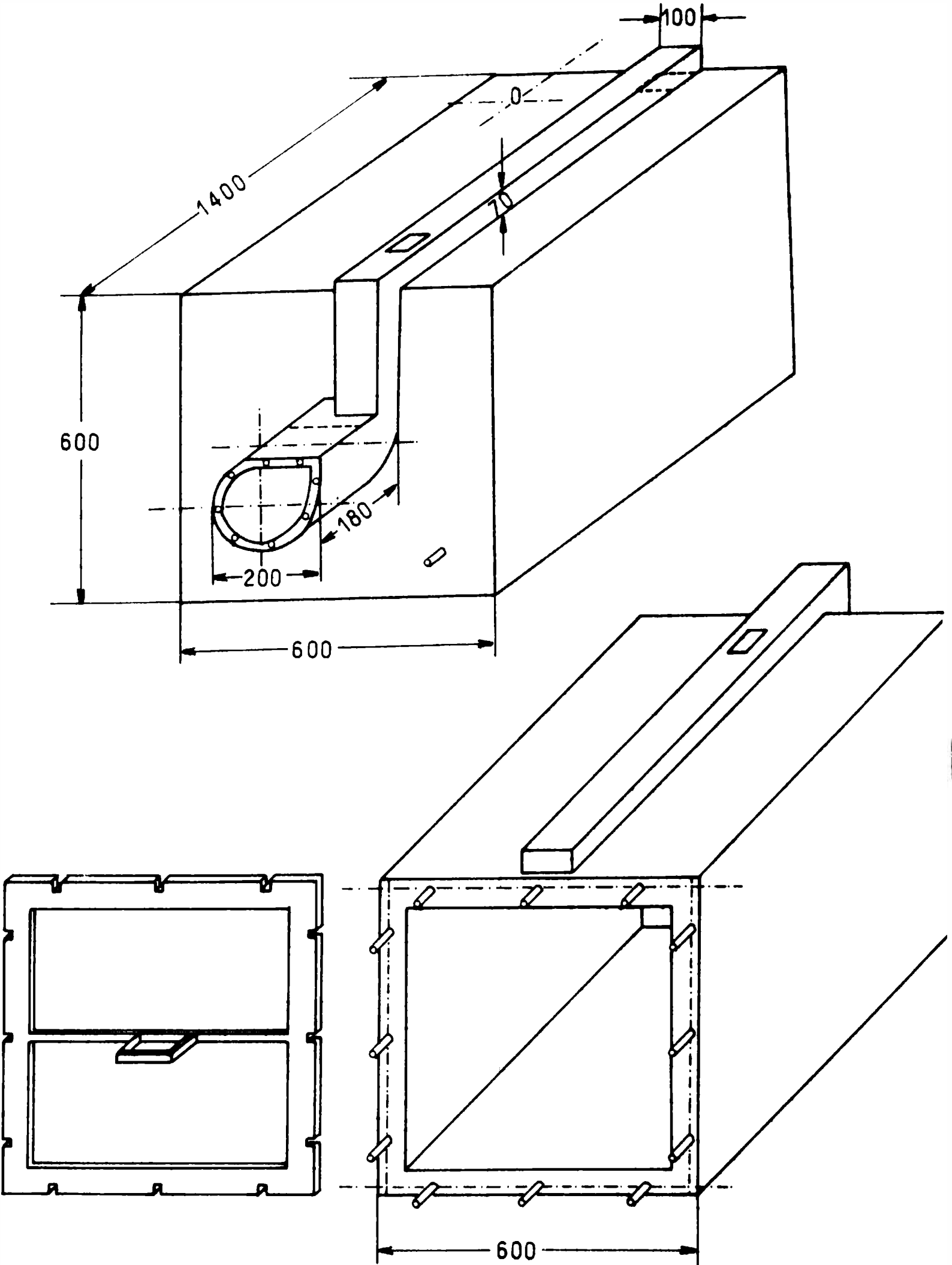
Se utilizaron cámaras con sistemas de refrigeración por ventilación forzada.- La producción de frío se consigue por expansión directa del fluido frigorífico, (freón 12). La renovación de aire se hizo por métodos mecánicos.-

El funcionamiento de la cámara es automático con regulación por termostato ambiente.-

Se trabaja a una temperatura igual a  $3 \pm 1^\circ\text{C}$ .-

### 2.3.- Celdas experimentales:

En el interior de la cámara frigorífica se introdujeron celdas experimentales, parcialmente estancas a los gases, que sirvieron de recinto de almacenamiento de los frutos. Se usaron celdas de 2 tipos, mostrándose un croquis de una de ellas en la fig. V-1. Las otras celdas consistieron en recipientes de polietileno.



lento de alta densidad provistos de entradas y salidas de gases para poder controlar la atmósfera.-

Las celdas del primer tipo fueron diseñadas en el Centro (Morgan, H.C. - Tomás, J.C. 1975).-

#### 2.4.- Control de la humedad relativa:

La humedad relativa se mantuvo a nivel constante mediante el uso de soluciones saturadas de sales, que tienen la propiedad de dar un grado definido de humedad en un ambiente cerrado, con movimiento de aire en su interior (Perry, 4º ed.). En nuestro caso la humedad relativa es de aproximadamente el 90%. La solución saturada que se usó fue  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .-

#### 2.5.- Obtención y regulación de la atmósfera:

La composición adecuada de la atmósfera se obtuvo por dosificación directa de los gases intervinientes, previo barrido con nitrógeno.-

Las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno se midieron mediante el empleo de un Orsat, utilizando soluciones absorbedoras KOH al 50% y pirogalol-alcalino, respectivamente.-

El control de la composición gaseosa se realizó desde un tablero central, donde existen las tomas de muestra de gases, el tren de purificación y los comandos eléctricos tanto de la turbina de recirculación como de la bomba de circulación. (Morgan-Tomás, 1975).-

Cada celda puede regularse independientemente.-

#### 2.6.- Esquema del ensayo de almacenamiento:

Las manzanas se colocaron en bandejas de cartón corrugado, del tipo de las de exportación, conteniendo 25 frutas cada una.-

Se almacenaron en las siguientes condiciones:

CELDA	% CO <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>	
1	0	21	(almac. ref. normal).-
2	2	6,0	(atmósfera controlada).-
3	5	6,0	(atmósfera controlada).-
4	10	6,0	(atmósfera controlada).-
5	20	6,0	(atmósfera controlada).-

La concentración de O<sub>2</sub> se dá con una precisión de  $\pm 1\%$ .-

En las celdas 1,2 y 3 se colocaron 6 bandejas respectivamente, mientras que - en las restantes se colocaron 10 manzanas en cada una. Periódicamente se sacó una bandeja, al azar, de las tres primeras celdas y tres frutas de las otras - dos.-

Sobre ellas se realizaron los ensayos que se indican en el capítulo siguiente y los que se dan a continuación.-

## 2.7.- Obtención de la polifenoloxidasas.

2.7.1.- Preparación de polvos de acetona: Se obtuvieron triturando la piel y - el corazón de la fruta en acetona pre-enfriada (-20°C) en una relación 1:2 - (p/v). Luego se filtraron y resuspendieron en acetona pre-enfriada dos veces - más. Finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente en lugar seco y oscu - ro. Luego se guardaron a -20°C hasta el momento de usarlos.-

2.7.2.- Obtención de la solución enzimática: Se preparó suspendiendo el polvo de acetona anterior en buffer fosfato 0,1M, pH=6,5 (1:50 p/v). La suspensión - obtenida se dejó en frío con agitación durante toda la noche, con el fin de - lograr una buena extracción. Luego se centrifuga a 3.000 r.p.m. y se filtra.- El filtrado constituye la solución enzimática.-

## 2.8.- Determinación del pH óptimo de reacción:

Se midió la actividad enzimática, como se describe en el párrafo siguiente, - en soluciones de distinto pH, utilizando siempre la misma solución de enzima. Las soluciones buffer que se utilizaron son las siguientes:

BUFFER	pH	BUFFER	pH
Fosfato 0,1M	6,00	Citrato-fosfato 0,1M	5,00
	6,50		5,50
	6,80		5,70
	7,00		6,00
	7,50		6,50
			6,80
			7,50

Los buffers se prepararon de acuerdo a las tablas dadas por Alexeyev (1960) y Lynch-Mellor (1972).-

## 2.9.- Determinación de la actividad fenolasa:

La actividad enzimática se determinó colorimétricamente usando catecol como - sustrato, en medio buffer citrato-fosfato 0,1M, pH = 5,7. Las lecturas se realizaron a 410 nm, conectándose la salida del espectrofotómetro a un regis-trador Sargent, realizándose las medidas con un valor de escala de 10 mV.-

La actividad se determinó tomando la pendiente de la curva al comienzo de la- reacción.-

Se define la unidad de actividad como la cantidad de enzima que provoca una - variación de la absorbancia de 0,001, por minuto, al comienzo de la reacción.



2.10.- Variación de la actividad fenolasa con el tiempo de almacenamiento y -  
la composición de la atmósfera:

Se midió la actividad fenolasa, tal como se describió antes, de las soluciones de enzimas obtenidas de las distintas muestras, retiradas de cámara periódicamente de los diferentes tratamientos.-

3.- RESULTADOS.

3.1.- Determinación del pH óptimo de reacción:

Con el fin de hallar el pH óptimo de reacción de la fenolasa de manzanas - - Granny Smith, se midió la actividad a distintos pH, desde 5,0 a 7,5, utilizando soluciones buffer fosfato 0,1M y fosfato-citrato 0,1M, obteniéndose los siguientes resultados, para una primera determinación:

pH medido	ACTIVIDAD FENOLASA (u/ml)		%
	Buffer fosfato	Buffer citrato-fosfato	
5,10	- - -	335,0	50,63
5,50	- - -	- - -	- - -
5,70	- - -	661,7	100,0
6,00	420,0	- - -	63,5
6,50	385,0	- - -	58,2
6,80	645,0	- - -	97,2
7,30	186,5	- - -	28,2

Como se obtuvieron los mayores resultados en medio buffer citrato-fosfato 0,1 M, se realizó una nueva serie de medidas en dicho medio. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo valor:

<u>pH</u>	<u>actividad (%)</u>
5,10	80,6
5,50	100,0
6,00	67,7
6,44	43,2
6,80	40,8
7,00	37,6

Para determinar con mayor precisión el pH óptimo, se realizaron medidas en un rango de pH más estrecho:

<u>pH</u>	<u>actividad (%)</u>
5,10	92,85
5,50	100,00
5,65	95,20
6,00	89,94

Los valores promedio se representan en el gráfico V-2.-

Luego, de estos resultados, podemos decir que el pH óptimo de reacción se halla entre los pH 5,5-5,7 para el sistema buffer citrato-fosfato 0,1M.-

### 3.2.- Variación de la actividad fenolasa con el tiempo de almacenamiento y la composición de la atmósfera:

Las determinaciones se realizaron tal como se describe en párrafos anteriores

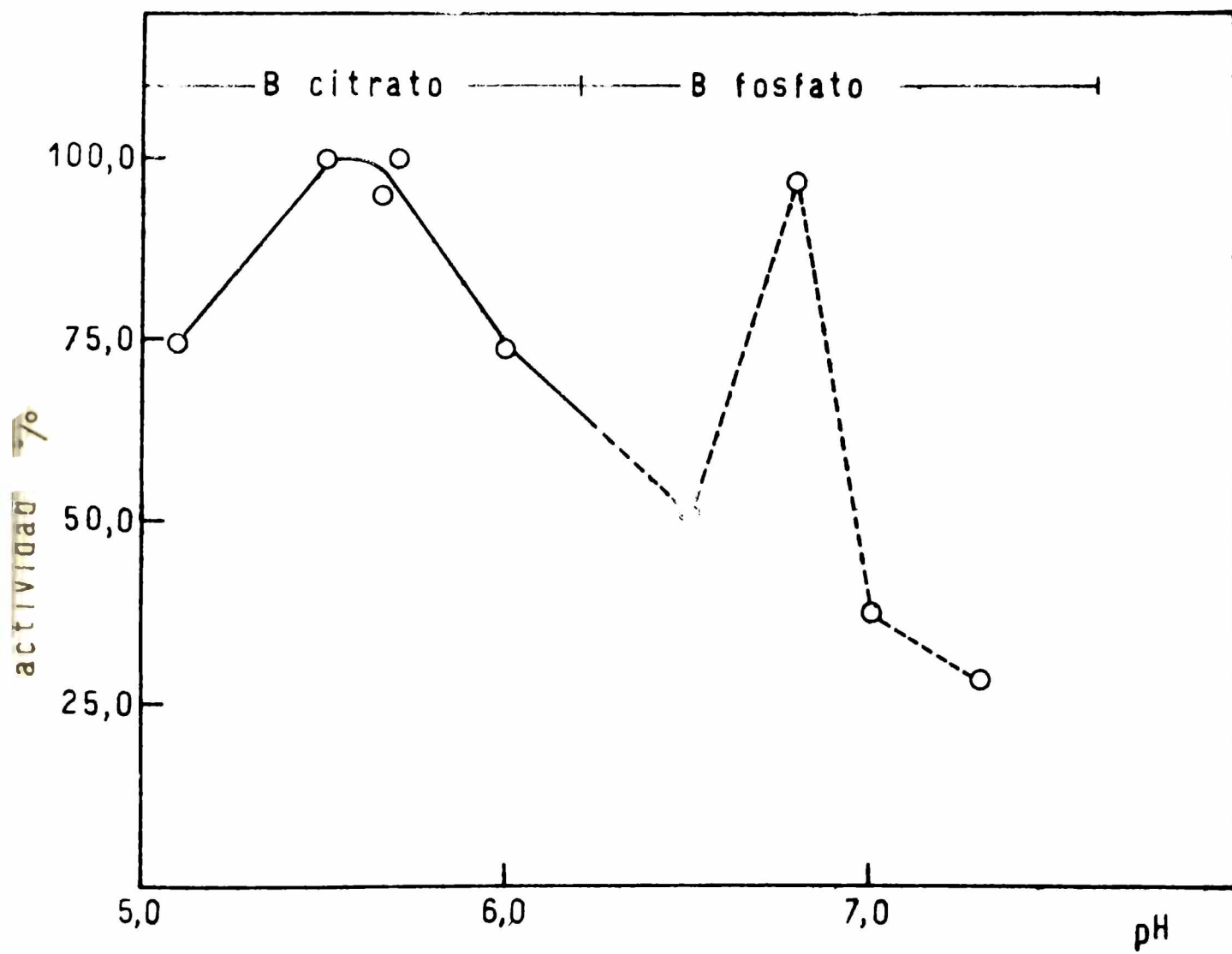


FIG. V-2

Los resultados se expresan como por ciento del valor correspondiente a las - muestras iniciales (recién arrivadas al laboratorio) cuyo valor de actividad- se toma como el 100%. -

Los datos obtenidos son:

Corrida 1

TIEMPO (días)	CELDA				
	1	2	3	4	5
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	25,90	8,00	11,30	7,60	6,24
185	12,90	9,70	17,14	- - -	- - -
250	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

Corrida 2

TIEMPO (días)	CELDA				
	1	2	3	4	5
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	34,80	10,70	15,30	10,26	8,43
185	17,30	13,00	20,21	7,05	15,31
250	14,40	23,01	6,01	0,00	9,23

### Corrida 3

TIEMPO (días)	CELDA				
	1	2	3	4	5
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	57,03	41,6	48,4	22,54	25,8
185	67,80	37,2	56,3	- - -	- - -
250	43,14	29,3	27,4	14,0	20,4

Los resultados obtenidos se promediaron para cada tratamiento y tiempo, a fin de obtener un cuadro único y poder aplicarle un tratamiento estadístico, para establecer si las diferencias existentes son significativas o sólo se deben al azar.-

La prueba estadística utilizada es el test LSD (least significant difference). El cuadro resumen es: (aparece graficado en la fig. V-3).-

TIEMPO (días)	CELDA					
	1	2	3	4	5	medias
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
100	39,24	20,10	25,00	13,47	13,49	22,26
185	32,67	19,97	29,27	7,05	15,31	20,85
250	28,77	26,16	16,70	7,00	14,82	18,69
medias	50,17	41,56	42,74	31,88	35,90	

Los valores hallados para la menor diferencia significativa entre tiempos y -

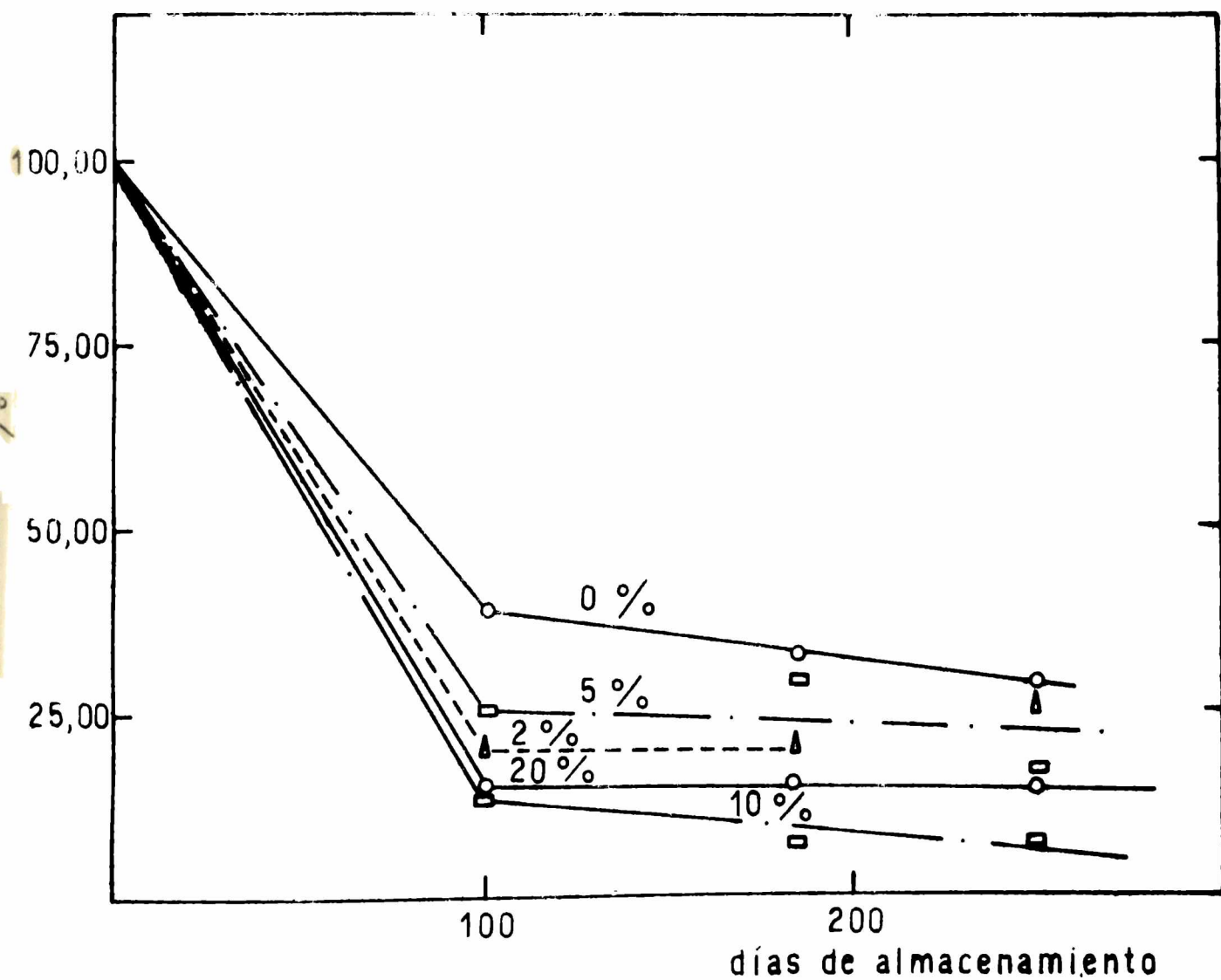


FIG. V-3

tratamientos con el 0,05 de significación, son: ( para el cálculo ver el apéndice 2)

$LSD_{0,05}$  por efecto tiempo = 59,72

$LSD_{0,05}$  por efecto tratamiento = 66,55

Luego observando las diferencias existentes entre las medias correspondientes a los distintos tiempos, vemos que hay sólo una diferencia significativa que corresponde a la abrupta caída en la actividad fenolasa en los primeros 100 días de almacenamiento en todos los tratamientos. Las diferencias entre los tiempos restantes no son significativas, o sea que se deben solamente al azar. En cuanto a las diferencias entre los tratamientos, ninguna es significativa.

#### 4.- DISCUSION

El ensayo de almacenamiento en escala piloto se realizó sobre manzanas Granny Smith por ser ellas una de las variedades de exportación, especialmente a los países europeos y por lo tanto se deben conocer sus mejores condiciones de conservación.

La temperatura de almacenamiento elegida es de 3°C pues las manzanas almacenadas en presencia de CO<sub>2</sub> son más susceptibles a sufrir daños por baja temperatura, razón por la cual se aconseja mantenerlas a temperaturas 1 - 2°C mayores que las utilizadas en almacenamiento refrigerado normal ( Fidler, 1973 ) En la literatura se aconseja conservar esta variedad de manzanas entre 0° y 1,5° Con el fin de estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento y de la composición de la atmósfera del mismo, fué necesario primero buscar un método simple y rápido de separar la enzima y que permitiera guardarla cierto tiempo a -20 grados, ya que se trabajaba con varias frutas de cada tratamiento y que todas las celdas debían ser abiertas aproximadamente al mismo tiempo, siendo imposible analizar todas las muestras en el momento.

El sistema, que ha nuestro entender, cumplía todos estos requisitos era la preparación de polvos de acetona, del cual se sabe por bibliografía mantiene bien la actividad enzimática durante aproximadamente un año, aunque en la realización de las determinaciones nunca se pasó de los nueve meses. De cualquier manera en todas las corridas se analizaron las muestras de los distintos tiem-pos y tratamientos en el mismo día, y se tomó la actividad fenolasa de la muestra inicial como el 100% y las demás como porcentajes de ella, a fin de anular posibles variaciones.

Obtenida la solución enzimática elegimos cómo método para determinar su actividad el espectrofotométrico ( ver capítulo 3 ) ya que las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

También fue necesario verificar el pH óptimo de reacción para medir la actividad. Al hacerlo se encontró que si bien a pH 6,8 se presentaba el máximo de actividad para el sistema buffer fosfato monobásico - dibásico 0,1 M, en presencia de citrato-fosfato 0,1 M se obtenían valores mayores que aquél, presentando un máximo entre 5,5 y 5,7. Luego todas las medidas de actividad se realizaron a este pH en presencia de dicho sistema buffer.

En cuanto de los resultados obtenidos respecto a la variación de la actividad polifenoloxidasas durante el tiempo de almacenamiento podemos ver que la misma cae rápidamente en los primeros 100 días, para permanecer luego aproximadamente constante, ya que las diferencias que se presentan son debidas al azar, según se concluye del tratamiento estadístico realizado. Lo antedicho es cierto para todos los tratamientos.

Esta conclusión contradice lo hallado por algunos autores, que como se dijo en la introducción, encontraron que la actividad catecolasa total aumentaba a través del tiempo de almacenamiento ( Samorodova-Bianchi et al. 1971, en manzanas y Birecki, M., et al. 1971 en papas). Pero concordaría con lo hallado



por Mondy et al. (1960) en papas.

Es probable que en el resultado influyan tanto la variedad, el sistema de cultivo, el de almacenamiento y la forma de extraer la enzima, como ya se dijo. Respecto a la influencia de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera de las celdas podemos decir, partir del tratamiento estadístico, que no hay diferencias significativas entre ellos. Aunque de los valores y del gráfico podría notarse la tendencia de los valores de actividad en presencia de  $\text{CO}_2$ , a mantenerse por debajo de los pertenecientes a las muestras almacenadas en aire.

De todo lo dicho podemos concluir que en manzanas Granny Smith almacenadas en presencia de distintas concentraciones de  $\text{CO}_2$  la actividad de la enzima polifenoloxidasas cae rápidamente al comienzo del almacenamiento, para permanecer luego prácticamente constante y que la presencia de  $\text{CO}_2$  tiene poco efecto sobre la misma aunque puede notarse una tendencia a adoptar valores inferiores a la actividad fenolasa que presentaron las muestras almacenadas en aire.

## VI.- EFECTO DE LA COMPOSICION DE LA ATMOSFERA Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO- SOBRE ALGUNOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE MANZANAS GRANNY SMITH

### 1.- INTRODUCCION

Numerosos trabajos se han realizado sobre el almacenamiento de manzanas, de diversas variedades, en atmósfera controlada, desde Kidd y West (1935) demostraron que éste prolongaba la vida de almacenamiento de ciertas manzanas inglesas. Así podemos citar a: Blanpied, G.B.- Smock, R.M. (1961); Smock, R.N. - Van Doren, A. (1939, 1941); Huelin, F.E.- Tindale, G.B. (1947); Stevenson, C.D.- Carrol, E.T. (1963); etc. La mayoría de ellos solamente han observado su efecto sobre la firmeza y la aparición de daños fisiológicos. Muy conocidos también son los trabajos de Fidler, J.C. y North C.J., acerca de la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la respiración de la manzana (1967-1971). Sin embargo son pocos los autores que han estudiado la variación de algunos otros parametros fisicoquímicos (Kalugina, E.V. (1973); Strandzhev, A. et al. (1973), etc.).

El almacenamiento de manzanas Granny Smith fué investigado principalmente en Australia en la década del 50, ya que es una de las variedades que más se produce y debido a la expansión de su industria. Stevenson, C.D. et al. (1961) halla que esta variedad de manzanas puede almacenarse con gran éxito en atmósfera controlada. Observó que la fruta almacenada en esas condiciones retiene mejor su firmeza y que hay menor frecuencia de aparición del daño desoggy., mientras que las escaldaduras superficiales aumentan al crecer la concentración de  $CO_2$ . Ellos hallan que la atmósfera más satisfactoria para la conservación es la que contiene 5% de  $O_2$ ; pero en ella el costo de eliminación del  $CO_2$  es alto, luego proponen usar un inhibidor de escaldaduras (difenilamina) y atmósferas con 16% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ .

Este trabajo lo desarrollaron durante ocho años.

Melville, F. y Hardisty, S.E. (1953) investigaron la forma de evitar las escaldas superficiales en la misma variedad hallando que un medio efectivo es envolver las frutas en papeles aceitados.

Nosotros estudiamos el efecto de las diferentes condiciones de almacenamiento sobre algunos parámetros fisicoquímicos: pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles, sólidos totales, pérdida de peso, contenido de compuestos fenólicos y firmeza. También hemos tenido en cuenta los cambios en calidad que fueron sufriendo los frutos

## 2.- MATERIALES Y METODOS

### 2.1.- Almacenamiento

La procedencia de los frutos y las condiciones de almacenamiento se detallan en el capítulo anterior. Las condiciones agronómicas de los frutales, así como los tratamientos que recibieron se presentan en el apéndice 3.

### 2.2.- Determinación del contenido en sólidos solubles

Se determinaron sobre una porción del zumo de un triturado de un peso conocido de fruto, midiendo su índice de refracción en un refractómetro del tipo ABBE. Los resultados se expresan en °Brix.

### 2.3.- Sólidos totales

Se determinaron por secado en estufa a 80°C y presión reducida, de un peso conocido de triturado, hasta peso constante. Los resultados se expresan en humedad %.

### 2.4.- pH

A una porción del triturado de peso conocido se le agregó una cantidad medida de agua destilada y se midió el pH mediante un pHmetro.

### 2.5.- Acidez titulable

Se halló por titulación directa de los ácidos presentes en la preparación anterior con NaOH 0,1 N hasta pH 8. Los resultados se expresan en mgr. de ácido cítrico por gramo de fruta fresca.

#### 2.6.- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (taninos) se determinaron utilizando el reactivo de Folin-Cicalteau sobre una porción de un extracto alcohólico (aproximadamente 80% en etanol) de la fruta. Los resultados se expresan en mgr. de ácido tánico por ml de extracto alcohólico.

#### 2.7.- Pérdida de Peso

Se determinó la pérdida de peso de la fruta individual mediante la diferencia entre el peso inicial, en el momento que entró a cámara, y el peso al salir de la misma. También se halla el peso promedio de la bandeja. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente para determinar la significación de las diferencias que se observan, mediante el test LSD (least significant difference) (Volk, W. 1958) para el 95% de significación.

#### 3.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos para las propiedades anteriormente enunciadas a los distintos tiempos de conservación y diferentes tratamientos se muestran en la tabla VI-1, como así también las características que presentan los frutos. Las cifras dadas son valores promedio, entre por lo menos, cinco réplicas.

También en dicha tabla se hallan los promedios correspondientes al efecto del tiempo y al efecto de cada tratamiento, como así mismo, los valores del LSD hallados. (Para su cálculo ver el apéndice 2).

De dichos resultados podemos decir que el contenido de sólidos solubles no presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En cuanto a su variación en el tiempo vemos que en todos los casos se presenta un aumento

Efectos del almacenamiento en Atmósfera Controlada y almacenamiento refrigerado normal sobre propiedades físico químicas de manzanas Granny Smith.

tratamiento	días de almac.	Sól. Solubles ("Brix)	acidez (mg. citr/ gr.)	pH	Taninos (mg Tán/ ml. Ext)	humedad %	pérdida de peso por fruta	Observaciones
Control	0	12,5	19,20	3,55	0,12	---	0,00	verdes-jugosas-ácidas
AR	100	13,5	11,71	3,73	0,14	88,67	3,23	verdes-jugosas-algo harinosas-mal sabor
	159	13,0	10,56	3,82	0,10	87,50	5,25	buenas-harinosas-mal sabor
	248	12,1	9,79	3,78	0,25	88,76	6,25	amarillentas-corazón negro-con escaldaduras
	media	12,8	12,82	3,72	0,15	88,31	3,68	
2:6	97	13,0	12,86	3,54	0,11	88,93	2,50	verdes-jugosas-ácidas
	159	13,5	10,90	3,80	0,09	80,60	2,62	idem
	249	12,8	9,02	3,74	0,12	87,80	4,05	verde amarillenta-jugosas-dulces
	media	13,0	13,00	3,66	0,11	85,78	2,29	core flush incipiente
5:6	96	14,2	12,10	3,63	0,14	88,25	2,70	verdes-jugosas-ácidas
	166	12,4	12,10	3,28	0,13	86,70	4,02	idem
	251	12,6	10,18	3,66	0,12	88,28	5,63	verde-amarillentas-buen sabor-core flush incipiente
	media	12,9	13,40	3,53	0,12	87,74	3,09	
10:6	101	15,1	12,48	3,69	0,10	---	/	verdes jugosas-ácidas
	221	12,4	11,33	3,92	0,07	---		daño interno y externo por CO <sub>2</sub>
	251	13,0	9,22	3,98	0,04	88,41		muy dañadas
	media	13,2	13,06	3,78	0,08	---		
20:6	102	13,2	14,21	3,74	0,09	88,50	/	buenas-ácidas-con escaldaduras-
	221	12,1	11,90	4,00	0,08	---		la concentración de CO <sub>2</sub> no es la correspondiente
	251	13,2	9,22	3,92	0,09	87,31		idem
	media	12,8	13,63	3,80	0,10	87,90		
efecto del tiempo (medias)	0	12,5	19,20	3,55	0,12	---	0,00	
	100	13,8	12,67	3,67	0,11	88,61	2,81	
	190	12,7	11,36	3,76	0,09	84,93	3,96	
	250	12,7	9,49	3,82	0,12	88,28	5,31	
LSD <sub>005</sub> por efecto tratamiento		0,92	0,95	0,22	0,058	4,87	1,10	
LSD <sub>005</sub> por efecto tiempo		0,82	0,85	0,19	0,052	4,87	1,28	

A.R.: atmósfera refrigerada

LSD.: menor diferencia significativa entre medias (least significant difference).

en los primeros 100 días de almacenamiento, para luego volver a caer a valores semejantes a los iniciales ( figura VI-2).

La acidez titulable, vemos, que en todos los casos disminuye durante el almacenamiento, siendo las diferencias halladas significativas, mientras que la presencia de  $\text{CO}_2$  sólo afecta ligeramente, notándose una tendencia a que la misma adopte valores más altos en su presencia que en almacenamiento refrigerado normal. (figura VI-3). Podemos observar también que los valores mas altos se hallan en el tratamiento con 20% de  $\text{CO}_2$ .

El pH aumenta durante el almacenamiento en todos los casos, presentándose diferencias significativas entre el valor inicial y los correspondientes a los 190 y 250 días. No hay diferencias significativas entre los tratamientos, excepto el de 5% de  $\text{CO}_2$  respecto a los que contienen 10 y 20% (figura VI-4).

Por otra parte el contenido de compuestos fenólicos (taninos) no varía significativamente ni con el tiempo, ni con los diferentes tratamientos. Puede verse que en presencia de 10 y 20% de  $\text{CO}_2$  cae más rápidamente, debido a la existencia de pardeamiento en la fruta.

En cuanto al contenido de sólidos totales (humedad) no varía significativamente entre los distintos tratamientos, pero disminuye durante el almacenamiento, mientras que, cómo es lógico, la pérdida de peso aumentó a través del mismo, siendo este aumento mayor en almacenamiento refrigerado normal. La pérdida de peso sería menor en 2% de  $\text{CO}_2$ .

Respecto a la firmeza de la fruta, la cual se midió mediante un penetrómetro diseñado en el CIDCA ( Morgan, H., Tomás J.O., 1975) podemos decir, que la misma disminuyó durante el almacenamiento, haciéndolo en menor proporción en presencia de  $\text{CO}_2$ . Así por ejemplo para los 250 días de almacenamiento la fué de:

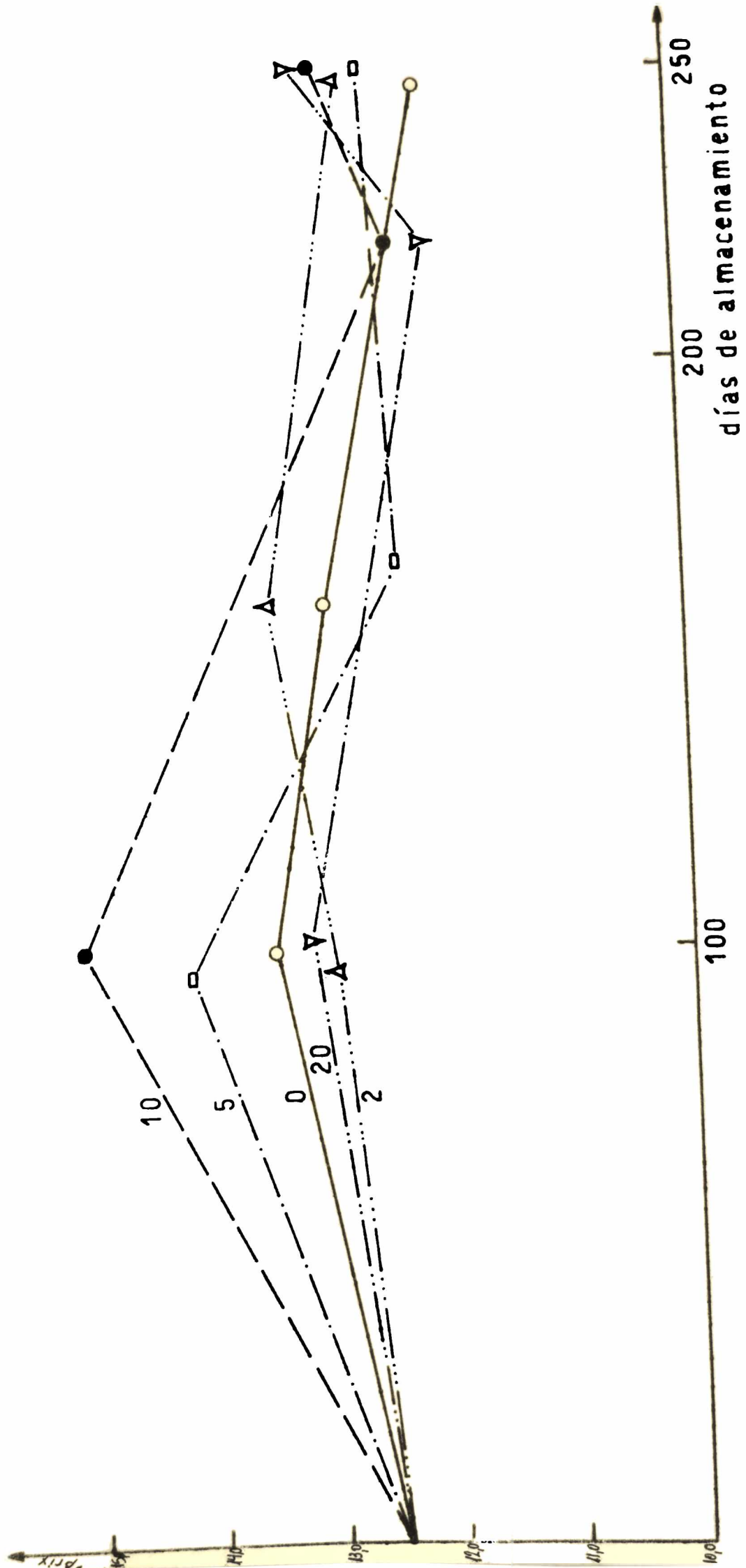


FIG. VI-2

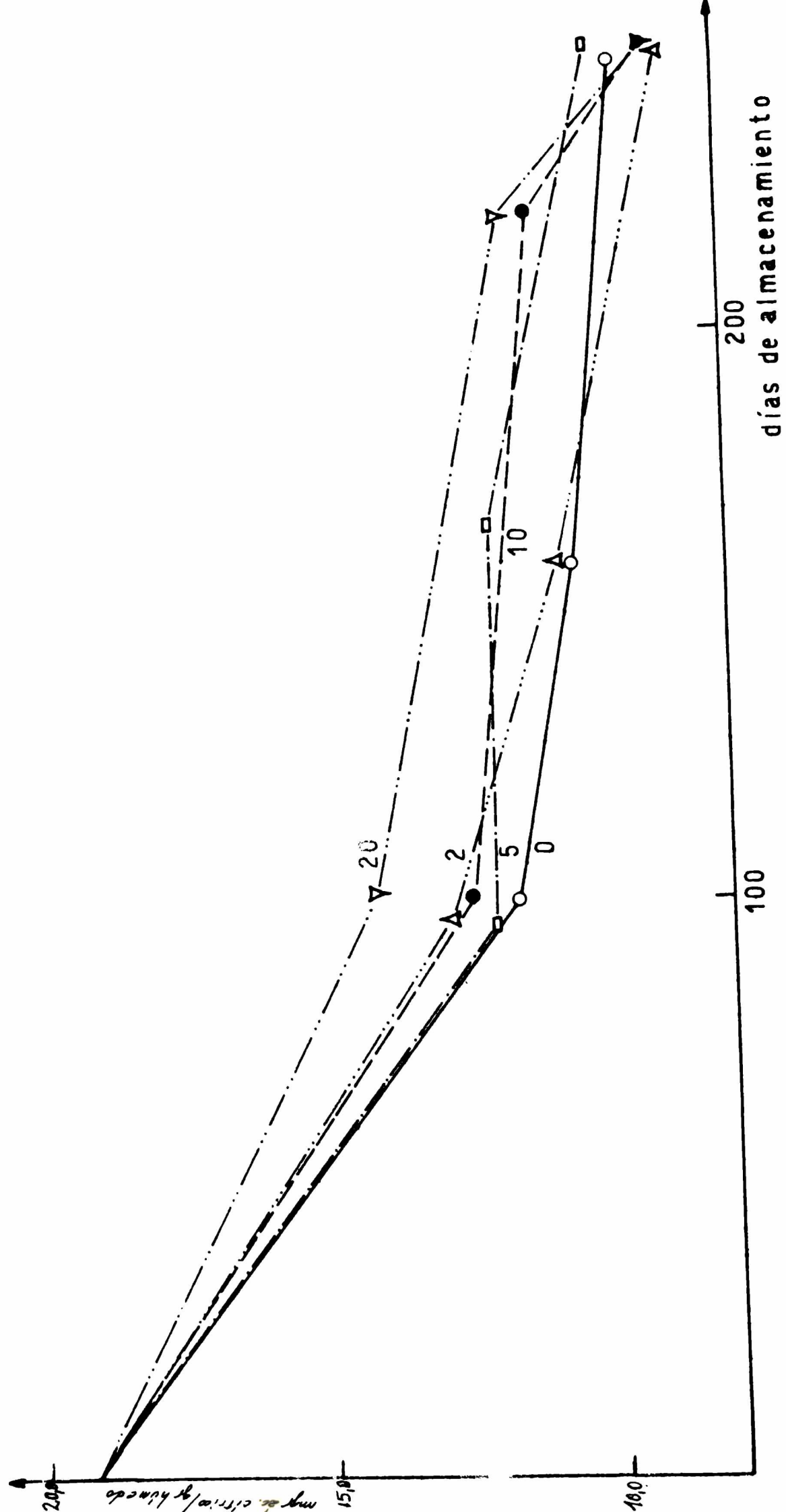


FIG. VI-3



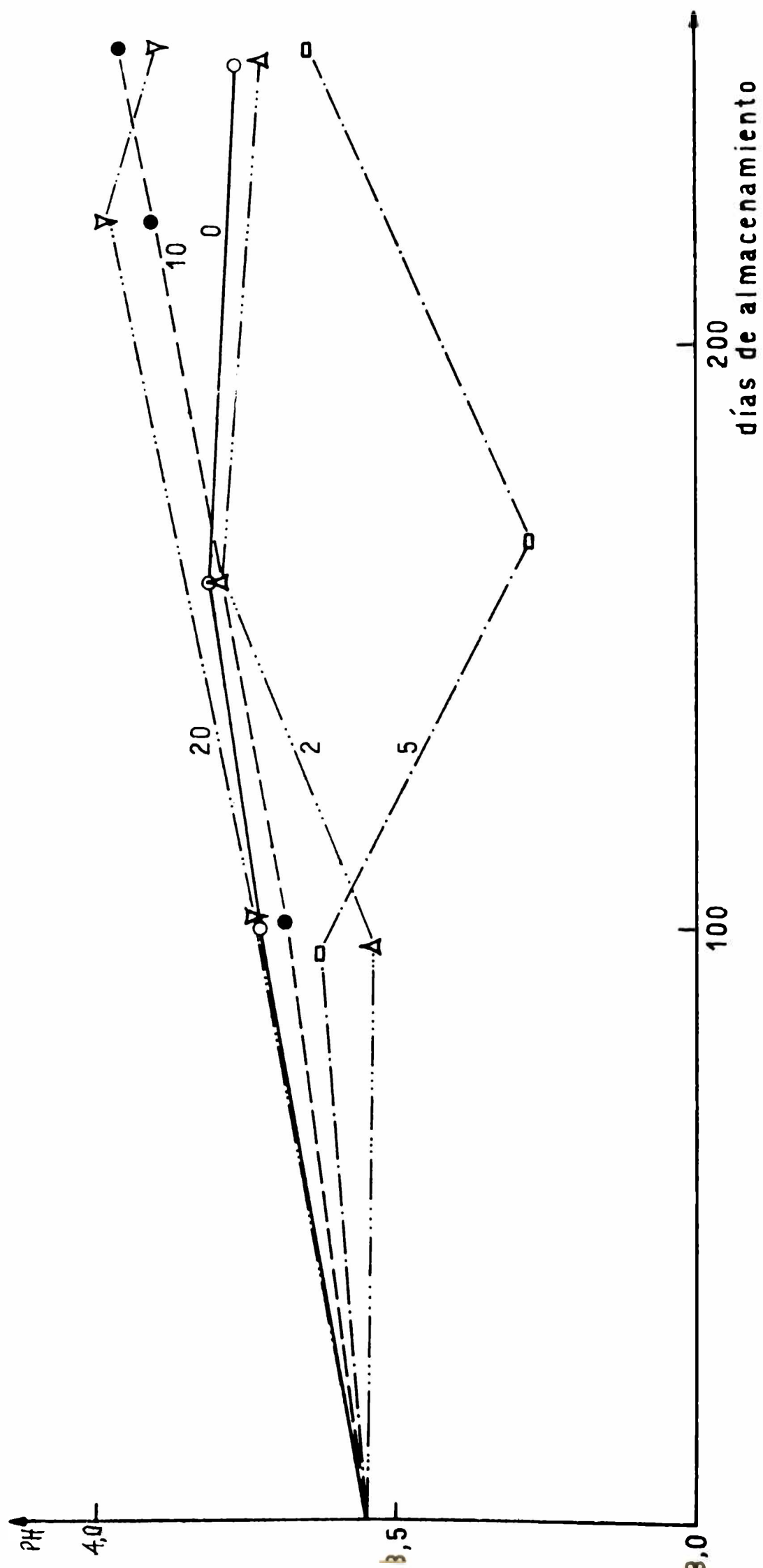


FIG. VI-4

% C O <sub>2</sub>	piel	pulpa
0	23,00 Kg	21,42 Kg
2	24,26 "	22,00 "
5	28,16 "	25,36 "

En lo referente al aspecto físico podemos decir que la fruta almacenada en 5% de CO<sub>2</sub> mantuvieron la calidad comercial durante más tiempo.

Los daños que hemos observado durante el almacenamiento fueron principalmente escaldadura superficial, condición de harinoso, pardeamiento interno (daño interno por alta concentración de CO<sub>2</sub>) y core flush (brown core) que es un síntoma de senescencia (Fidler et al. 1973).

Los frutos conservados en almacenamiento refrigerado normal presentan la condición de harinoso y sabor a fermentado luego de los primeros 150 días, no así las conservadas en atmósfera controlada, ni siquiera al fin del ensayo.

El daño conocido como core flush aparece en todos los casos a los 250 días, siendo mas grave en almacenamiento refrigerado normal y mucho menor en presencia del 5% de CO<sub>2</sub>.

Las manzanas almacenadas en 10% de CO<sub>2</sub> ya a los 200 días presentaban daños por CO<sub>2</sub> tanto interno como externo (pardeamiento). Lo mismo sucede con las almacenadas en 20% pero se presenta antes. Este daño no lo presentan las almacenadas a niveles inferiores de CO<sub>2</sub>.

El tipo de escaldadura que mas se presenta fué el Sunburn scald, con igual frecuencia en todos los tratamientos. Lo mismo sucede con los otros tipos de escaldaduras superficiales.

No se observó la presencia de hongos. En todos los casos crecieron en el cabo y cáliz. En cuanto a podredumbres fúngicas se dieron con poca frecuencia en

todos los casos, siendo algo mayor en los frutos almacenados en aire.

Las frutas almacenadas en aire a los 250 días se hallaban en condiciones muy inferiores en cuanto a calidad que las almacenadas en atmósfera controlada.

#### 4.- DISCUSION

De los resultados obtenidos, podemos decir, que en general las distintas composiciones atmosféricas no tuvieron efectos significativos sobre los parámetros físicos y químicos estudiados, pudiéndose hablar luego de tendencias.

No sucedió lo mismo en cuanto a las variaciones a través del tiempo, que casi siempre presentaron diferencias significativas.

El hecho de que la acidez titulable disminuya durante el almacenamiento, siendo dicha disminución menor en presencia de  $\text{CO}_2$  es coincidente con lo hallado en la literatura. (Kalugina E.V. 1973; Minata T. y Minamichi, T. 1970; Porritt S. W. 1966, etc.).

Lo mismo sucede con lo hallado respecto a la pérdida de peso y la firmeza. En cuanto a que en presencia de 10 % de  $\text{CO}_2$  se produjera ya un gran deterioro de la fruta por pardeamiento tanto interno como externo está de acuerdo con lo dicho antes respecto a la inhibición de la enzima succinicodehidrogenasa por el  $\text{CO}_2$ , lo cual produce la acumulación de ácido succínico, que produce la muerte celular y el posterior pardeamiento, con el consiguiente consumo de los compuestos fenólicos endógenos de la fruta. Esto se vió reflejado en los valores hallados para el contenido de taninos en la fruta almacenada en 10 y 20% de  $\text{CO}_2$ . También podría producirse una acumulación de acetaldehído y etanol, en cuyo caso también provocarían la muerte celular y el pardeamiento. El pH tendió a aumentar con el tiempo, lo cual concuerda con la disminución de la acidez.

En cuanto a las enfermedades de almacenamiento no parasitarias, no encontramos, a diferencia de Stevenson, C.D. et al. 1961, un aumento significativo de

de las escaldaduras superficiales en los tratamientos con  $\text{CO}_2$ , excepto para 10 y 20%. No se realizó un tratamiento estadístico de la frecuencia de aparición de escaldaduras, por ser ésta muy baja durante todo el almacenamiento, a pesar de no haberse envuelto las manzanas en papel aceitado. Como ya se dijo anteriormente el tipo de escaldadura mas frecuente fueron la sunburn scald y stem-end scald, que si bien no afectan el sabor de la fruta, sí afectan su apariencia exterior.

En cuanto a las enfermedades de origen fúngico no han sido muy frecuentes en ninguno de los tratamientos. Se presentaron en mayor escala en almacenamiento refrigerado normal. Su presencia fué nula en las celdas con 10 y 20% de  $\text{CO}_2$ . De todos los resultados obtenidos en este ensayo de almacenamiento en escala piloto, podemos decir que las frutas almacenadas en presencia de  $\text{CO}_2$  y menor contenido de  $\text{O}_2$  se mantuvieron en mejores condiciones que las almacenadas en aire, pero que cuando se aumentó el tenor de  $\text{CO}_2$  de 5 a 10% se notó ya, un gran deterioro de la fruta al poco tiempo de almacenamiento.

En nuestro ensayo, las frutas almacenadas en 5% de  $\text{CO}_2$  y 6%  $\text{O}_2$  fueron las que retuvieron su calidad comercial durante mas tiempo.

## VII.- DISCUSION GENERAL

La calidad comercial de las manzanas almacenadas es afectada por numerosas enfermedades de almacenamiento, algunas parasitarias y otras no parasitarias-fisiológicas-. Entre éstas últimas unas de las más comunes son las relacionadas con el pardeamiento, el cual puede ser tanto interno como externo.

Desde hace mucho tiempo se notó que este daño estaba influenciado por la concentración de  $\text{CO}_2$  de la atmósfera de la cámara. Se sabía que cuando la concentración del mismo era superior a la del aire, pero no muy alta, disminuía su frecuencia de aparición, mientras que a concentraciones muy altas, mayores al 10%, se incrementaban notoriamente.

Hulme, A.C. en 1956 establece que dicho incremento se produce por la acumula-ción de ácido succínico que provoca la muerte celular, y posteriormente el pardeamiento. Un poco mas tarde Ranson, S.L.; Walker, D.A. y Clarke, I.D. (1958-1960) establecen que dicha acumulación se produce debido a la inhibición de la succínicodeshidrogenasa por el  $\text{CO}_2$

También se sabía que el pardeamiento se produce cuando se ponían en contacto por cualquier causa, ya sea internas o externas, la enzima polifenoloxidasa y los polifenoles que contiene la fruta.

Luego, nosotros decidimos estudiar el porqué la menor frecuencia de aparición del pardeamiento enfocando el estudio hacia la influencia del  $\text{CO}_2$  sobre la actividad de dicha enzima. Nuestra primera intención fué preparar triturados de la fruta, -manzanas Red Delicious, pues son de facil adquisición en el comercio local y se encuentran durante todo el año- y observar la velocidad de pardeamiento, pero los resultados obtenidos presentaban una gran dispersión. Era evidente que estaban influenciados por el estado de los frutos. Pensamos luego, que si adicionábamos a un medio de reacción tamponado conteniendo catecol,

una pequeña cantidad del triturado filtrado podríamos obtener mejores resultados. Pero sucedió lo mismo que en caso anterior.

Frente a ello decidimos aislar y purificar parcialmente la fenolasa, para de esa manera anular el efecto de la electoriedad del estado original de la fruta. Para ello se ubicó, primeramente, en qué zonas de la manzana era mayor la concentración de enzima, hallándose que ellas eran la piel y el corazón. Luego se tomaron esas zonas para preparar la enzima.

Con el fin de mantener libre a los fenoles endógenos de la fruta de la oxidación durante la extracción, se ensayó la eficacia de distintos inhibidores de la oxidación. Los mejores resultados se obtuvieron con sacarosa, clorhidrato de disteína y EDTA. También se determinó, mediante el método espectrofotométrico, el pH óptimo de reacción, estableciéndose que el mismo es 6,8 para el sistema buffer fosfato 0,1M. La extracción se realiza a pH 6,5, siempre con la facilidad de minimizar la reacción de oxidación.

Luego la enzima se separa por precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  entre 40 y 100% de saturación y se purifica por cromatografía a través de sephadex G-200. De esta manera se logra una purificación de aproximadamente 40 veces.

Para medir la actividad de la fenolasa también se presentaron problemas, sobre todo cuando trabajábamos a bajas temperaturas y en presencia o no de  $\text{CO}_2$  con el método espectrofotométrico, ya que los equipos existentes con posibilidades de termostatzación no podía evitarse el empañado de las cubetas y por ende lecturas incorrectas y en los equipos sin temperatura controlada, al aumentar la misma durante las lecturas, se producía el desprendimiento de  $\text{CO}_2$ . Luego fué necesario construir un electrodo de oxígeno, que como había sido diseñado para ser usado en fermentadores, fué necesario comprobar su idoneidad para medir la actividad enzimática.

Para ello se determinó la velocidad de respuesta para el 90% de la respuesta

total era de  $1,0 \pm 0,3$  minutos, que la tensión en ausencia de  $O_2$  era pequeña y que permitía medir la velocidad de reacción inicial. También se comprobó que su respuesta frente a distintas cantidades de enzima era lineal, y se estableció que la precisión del método era de  $\pm 0,1$ mv.

Luego comenzamos a estudiar el efecto del  $CO_2$  sobre la polifenoloxidasa encontrando que la misma es inhibida en forma reversible y específica por el  $CO_2$ . Con 15% de  $CO_2$ , a  $15^\circ C$ , se produce un 50% de inhibición. Para conocer más de esta inhibición investigamos a qué tipo pertenecía. Para ello se midió la actividad enzimática a distintas concentraciones de sustrato y de inhibidor, y se construyeron los gráficos de Linwaver-Berk, como así también las pendientes y ordenadas del anterior versus la concentración del inhibidor. Con los gráficos de Dixon y Cornish, y los anteriores, el estudio conjunto determinó que la inhibición es de tipo competitivo. Esto encontramos que se cumple tanto para extractos crudos como para las soluciones enzimáticas purificadas y a todas las temperaturas ensayadas.

En cuanto al efecto de la temperatura podemos decir: su aumento provoca la elevación del porcentaje de inhibición para un mismo contenido de  $CO_2$  y que la energía de activación calculada a partir de la ecuación de Arrhenius fué de 22,09 kcal/mol para la solución enzimática purificada y 17,59 para los extractos crudos a todas las concentraciones de  $CO_2$  ensayadas. Estos valores son 5 veces mayores que los hallados en la literatura.

Hasta aquí lo estudiado "in vitro", era ahora necesario ver que pasaba en un almacenamiento en escala piloto de manzanas. Para este ensayo se eligió la variedad Grany Smith por ser una de las que más se exporta a Europa, siendo por lo mismo necesario mantener la calidad comercial de las mismas durante más tiempo.

Las frutas se almacenan en presencia de 6 % de  $O_2$  y 2,5, 10 y 20 % de  $CO_2$ .

También se realiza un almacenamiento en aire como control. La temperatura es de 3° C.

Las muestras se extrajeron periódicamente y al mismo tiempo de todos los tratamientos, luego se prepararon polvos de acetona de ellas, para luego obtener las soluciones enzimáticas y medir su actividad. Se encontró que la actividad catecolasa disminuía significativamente en los primeros 100 días de almacenamiento, manteniéndose luego aproximadamente constante. No se notaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Esto es correcto ya que la reacción de inhibición es reversible, o sea que al desaparecer la causa también desaparece el efecto.

No sólo estudiamos el efecto del almacenamiento sobre la catecolasa, sino también sobre otros parámetros físico-químicos y sobre la calidad comercial de la fruta.

Así podemos decir que la presencia de  $\text{CO}_2$  hace que la fruta retenga su firmeza por más tiempo, que su pérdida de peso sea menor, que la acidez titulable disminuya en menor grado que en almacenamiento refrigerado normal. Mientras que los distintos tratamientos no tienen efectos significativos sobre el contenido de sólidos solubles, sólidos totales, pH, y contenido de compuestos fenólicos. Sí se notan variaciones de todos estos parámetros con el tiempo de almacenamiento, excepto la concentración de taninos que permanece prácticamente constante,

En cuanto a los daños tanto fisiológicos como parasitarios son un tanto mas frecuentes en el almacenamiento refrigerado normal que en los tratamientos con 2 y 5% de  $\text{CO}_2$ . Con 10% de  $\text{CO}_2$  los daños ( pardeamiento interno y externo ) son muy graves ya a los 200 días de almacenamiento.

Encontramos que las condiciones óptimas de almacenamiento en este ensayo fueron 6%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ .



De todo lo dicho anteriormente podemos concluir que la menor frecuencia de aparición de pardeamiento en la fruta almacenada en presencia de  $\text{CO}_2$  es la inhibición de la enzima polifenoloxidasas por el  $\text{CO}_2$ , y la disminución de su actividad con el tiempo de almacenamiento, ya que la concentración de sustrato, los compuestos fenólicos, se mantienen prácticamente constante e igual en todos los tratamientos.

También concluimos que la fruta almacenada en 6% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  mantiene su calidad comercial durante más tiempo ( el ensayo duró nueve meses ) que las almacenadas en otros tratamientos.

*W. L. H. S.*

# VIII BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J.W. (1968) Phytochem. 2, 1973
- Baruah, P. et al. (1953) Biochem.J. 55, 392
- Bendall, D.S., Ranson S.L., Walker D.A. (1958) Nature, 181, 133
- Bendall, D.S., Ranson S.L., Walker D.A. (1960) Biochem.J. 76, 221
- Birecki, M. et. al. Amer.Potato J. 48 (7), 255-261 (1971)
- Blandpied, G.D., Smock, R.N. (1961) A.Soc.Hort.Sci. 78, 35
- Boletín Estadístico Trimestral ( 1976) INDEC
- Braverman, J.B.S. "Introducción a la bioquímica de los alimentos" Ed.Omega
- Clark, L.C. (1956) Trans.Amer.Soc.Art.Int.Organs 2, 41
- Cornish - Bowden, et al. (1974) Biochem.J. 137, 143-144
- Dall'Aglio, G., Casoli (1970) Ind.Conserve 45, 131
- Dixon, M., Webb, E.C. (1958) Enzymes.Chapt. 2-4. Longmans Green and Co.Londres
- Dizik, N.S., Knapp, F.N. (1970) J.Food Sci. 35, 282
- Fidler, J.C., North, C.J. (1966) Boletín del Ins.Internac.del Frio, Boloña
- Fidler, J.C., North, C.J. (1967) J.Hort. Sci. 42, 189-206
- Fidler, J.C., North, C.J. (1967) J.Hort. Sci. 42, 207-221
- Fidler, J.C., North, C.J. (1968) J.Hort. Sci. 43, 429-439
- Fidler, J.C., North, C.J. (1970) J.Hort. Sci. 45, 197-204
- Fidler, J.C., North, C.J. (1971) J.Hort. Sci. 46, 245-250
- Fidler, J.C., Wilkinson, B.G. et.al. (1973) The Biology of Apple and Pear  
Storage C.A.B., London
- Forsyth, W.G.C. (1964) Ann.Rev.Plant, Physiol. 15, 443
- Guadagni et al. (1949) Food Technol. 3, 359-364
- Handbook of Chem, and Physics 48 th. ed 1967-68

- Harel,E. et al. (1964) *Physiol.Plant.* 17,921
- Harel,E. et al. (1965) *Phytochem.* 4, 783
- Harel,E., Mayer,A.M. (1968) *Phytochem.* 7, 199-204
- Horowitz,N. et al.(1970) *Methods in Enzymol.* XVII - Part.A , **618**
- Huelin,F.E.,Tindale,C.B. (1947) *Tech.Bull.Vict.Dept.Agric.*Nº6
- Hulme,A.C. (1956) *Nature, London*, 178-218
- Hulme,A.C. (1958) *Adv.Food Res.* 8, 297
- Hulme,A.C., Rhodes,M.J.C. (1971)"*The Biochem.of fruits and their pruducts*,  
Chapt. X, Vol 2, Academic Press"
- Ingrahan,L.L., (1954) *J.Am.Chem.Soc.* 76,3777
- Ingrahan,L.L., (1955) *J.Am.Chem.Soc.* 77,2875
- INTA (1975)
- IUB (1964) *Comission on Enzymes of inter.of biochem.* (1964) Report Elsevier  
Amsterdam
- Johnson,M.J. et al. (1964) *Biotechnol.and Bioengineering* 6, 514
- Johnson,M.J. et al. (1967) *Biotechnol.and Bioengineering* 9, 635
- Joslyn, M.A.,Ponting,J.D. (1951) *Adv. Food Research* 3, 1
- Kalugina,E.V. (1973) *Vestn.Leningrad Univ.,Biol.* 3, 97-108
- Keilin,D.,Mann,T.(1938) *Proc.Rot.Soc. London.* 125, 187
- Kidd,F.,West,C. (1935) *Food Invest.Leaf1.Dept.Sci.Industr.Res.,London*, Nº6
- Kramer,P.J. (1955) *Encyclopedia of Plant Physiol.* 1, 649
- Kubowitz,F. (1937) *Biochem,Z.* 292, 221
- Lanzarini et al. (1972) *Phytochem* 11, 89-94
- Lindet (1985) *Compt.Rend.*120, 370-2
- Loomis, W.D.,Battaile,J. (1966) *Phytochem.*5,423
- Lowry,H.O. (1951) *J.Biol.Chem.* 193, 265

- Luh, B.S., Phitthakpol, B.J. (1972) Food Sci. 37, 264
- Mason, N.S., (1955) Adv. Enzymol. 16, 105
- Mayer et. al. (1966) Phytochem. 5, 783
- Melville, F., Hardisty, S.E., (1953) J. Agricultural W. Australia Ser. 3, 2, 101
- Miller, G.W., Evans, H.J. (1956) Nature, London, 178, 974
- Miller, W.H., Mallette, M.F. et al. (1944) J. Am. Chem. Soc. 66, 514
- Minata, T., Minarmich, T. (1970) Plant and cell Physiol. (Tokio) 11 (6), 857-83
- Mondy, N.I. et al. (1960) Food Res. 25, 693-705
- Morgan, H., Tomás, J. (1975) Publ. Interna CIDCA Nº 10
- Morgan, H., Tomás, J. (1975) Publ. Interna CIDCA Nº 11
- Nelson, J.O. (1973) Controlled test Atmospheres. Ann Arbor Sci.
- Nelson, R.M., Mason, H. (1970) Methods in Enzymol. XVII, part. A 626
- Nelson, J.M., Dawson, C.R. (1944) Adv. Enzymol. IV, 99-152
- Onslow, M.W. (1920) Biochem J. 14, 535
- Patterson, H., Workan, J. (1962) Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 80, 130
- Perry, J. (1965) Chem. Eng. Handbook, 4th. Ed. 15-41
- Plank, R. (1963) El empleo del frio en la industria de la alimentación.  
pag. 527 - Ed. Reverté
- Ponting, J.D., Joslyn, M.A. (1948) Arch. Biochem 19, 47
- Ponting, J.D., Joslyn, M.A. (1957) Adv. Food Res. 3, 1-37
- Porrit, S.W. (1966) Can J. Plant. Sci. 46, 317 - 21
- Porrit, S.W., Meherink, M. (1968) Can. Inst. Food Tech. J. 1, 94-97
- Ranson, S.L., Walker, D.A., Clarke, I.D. (1957) Biochem J. 66, 57P
- Ranson, S.L., Walker, D.A., Clarke, I.D. (1960) Biochem J. 76, 216
- Sal'kova, E.G. et al. (1970) Dokl. Akad. Nauk sssr 192 (6) 1380
- Samorodova — Bianki, et al (1971) Soviet Plant Physiol. 18, 875
- Smith, H. (1957) Nature, London, 179, 876

- Smock, R.N., Van Doren, A. (1939) Refrig. Enng. 38, 163
- Smock, R.N., Van Doren, A. (1941) Bull. Cornell. Agric. Sta. N°762
- Stelzig, D.A. et al. (1972) Phytochem 11, 535
- Stevenson, C.D., et al. (1961) Queensland J. Agric. Sci. 18, 463
- Stevenson, C.D., Carroll, E.T. (1963) Queensland J. Agric. Sci. 20, 185-190
- Stevenson, C.D., Carroll, E.T. (1964) Queensland J. Agric. Sci. 21, 147-51
- Strandzhev, A. et al (1973) Guadinar. Lozar. Menka 10 (5) 13-18
- Swain, T., (1965) Int Biochem. Ed. Bonner Varner Pag. 652, A. Press, N.Y.
- Szent, Györgyi (1925)
- Tate, J.N., Luh, B.S., York, G.K. (1964) J. Food Sci. 29, 829
- Thomas, M. (1925) Biochem. J. 19, 927
- Umbreit, W.N. et al. (1949) Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Chap 3  
Burges Publ. Co. Minneapolis.
- Volk, W. (1958) Applied Statistics for Engineers. Mc Graw-Hill
- Walker, J.R.L. et al (1965) Phytochem 4 (5), 677-685
- Walker, J.R.L., Hulme, A.C. (1966) Phytochem. 5, 259
- Walker, D.A., Brown, J.M.A. (1957) Biochem. J. 19, 927
- Wankier, R.N. et al (1970) J. Am. Soc. Hort. Sci. 95 (5) 604-609
- Williams, A.H. (1960) Phenolics in plants in health and disease, pag. 3. Pergamon  
Press, Oxford.

## APENDICE 1

Datos correspondientes a la actividad de la enzima polifenoloxidas a diferentes concentraciones de sustrato, (catecol) y de inhibidor ( $\text{CO}_2$ ), para varias temperaturas.-

Se dan valores tanto para soluciones parcialmente purificadas como para extractos crudos.-

También se presentan las cifras correspondientes a la actividad de la misma enzima en presencia de NaCl en concentraciones variables.-

Todos los valores son promedios entre varias determinaciones y se expresan en unidades/min. (para la definición de unidad de actividad ver capítulo IV)

Solución enzimática parcialmente purificada. Temperatura:  $0^\circ\text{C}$ .-

(S) moles/lit	% $\text{CO}_2$			
	0	5	10	20
0,045	0,90	0,75	0,65	0,50
0,023	0,85	0,55	0,60	- - -
0,009	0,60	0,45	0,25	0,50
Actividad Para (NaCl) = % $\text{CO}_2$	- - -	0,50	0,60	0,75

Temperatura: 5°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>				
moles/lit	0	5	10	20	30
0,045	0,50	0,25	0,45	0,55	0,40
0,023	0,50	0,37	0,30	0,20	0,45
0,009	0,35	0,17	0,15	- - -	0,20
actividad para (NaCl)=%CO <sub>2</sub>	- - -	0,25	0,45	0,40	0,45

Temperatura: 10°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>				
moles/lit	0	5	10	20	30
0,045	2,15	1,00	1,55	1,45	1,85
0,023	1,30	1,35	1,10	1,10	1,25
0,009	1,05	1,05	0,85	1,45	0,95
actividad para (NaCl)=%CO <sub>2</sub>	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

Temperatura: 20°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>				
moles/lit	0	5	10	20	30
0,045	16,35	11,75	10,50	7,90	8,30
0,023	13,00	10,85	8,80	6,65	- - -
0,009	10,35	7,46	6,10	4,60	- - -
actividad para (ClNa) = %CO <sub>2</sub>	- - -	13,40	10,30	8,90	9,00

Soluciones enzimáticas crudas.-

Temperatura: 0°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>				
moles/lit	0	5	10	20	30
0,045	1,10	0,95	0,80	0,75	0,70
0,023	0,90	0,75	0,65	0,70	0,60
0,009	0,80	0,55	0,50	- - -	0,35
actividad para (NaCl) = %CO <sub>2</sub>	- - -	0,90	0,85	0,80	0,80



Temperatura: 10°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>				
moles/lit	0	5	10	20	30
0,045	8,25	6,25	6,30	6,25	5,58
0,023	6,25	5,90	5,75	5,40	5,12
0,009	4,60	4,70	4,10	3,80	3,35

Temperatura: 15°C.-

(S)	% CO <sub>2</sub>						
moles/lit	0	5	10	20	30	40	50
0,045	11,28	10,80	9,47	8,37	7,80	6,25	4,70
0,023	11,17	10,27	7,80	8,63	6,10	4,40	- - -
0,009	9,60	7,80	5,20	5,00	- - -	3,50	- - -
actividad para (NaCl) = %CO <sub>2</sub>	- - -	11,97	8,34	9,63	9,00	7,85	7,70

## APENDICE 2

El cálculo estadístico se realiza por el test LSD (least significant difference) (Volk W. 1958) para dos variables y el 0,05 de significación, mediante el siguiente cálculo:

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
Efecto entre columnas	$\frac{\sum (\text{tot. columnas})^2}{n} - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	$n' - 1$	$\sigma^2 + n \sigma^2(c)$
Efecto entre filas	$\frac{\sum (\text{tot. filas})^2}{n'} - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	$n - 1$	$\sigma^2 + n' \sigma^2(r)$
Error	Diferencia	Diferencia	$\sigma^2$
TOTAL	$\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	$N - 1$	

Donde:  $x_i$  = datos.-

$N$  = número total de datos.-

$n$  = número de datos en cada columna.-

$n'$  = número de datos en cada fila.-

$\sigma^2$  = varianza.-

Y como:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \implies |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| = t \cdot S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = LSD$$

Donde:  $t$  = estadístico de Student.-

$\bar{X}_i$  = valor de alguna serie de datos.-

$S_{\bar{X}_i - \bar{X}_j} = S \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}}$  , estimación del error típico de la media.

Si  $n_1 = n_2$  (número de datos para el cálculo de  $\bar{X}_i$ ).-

$$S_{\bar{X}_i - \bar{X}_j} = \frac{S}{\sqrt{n_i}} \sqrt{2}$$

Siendo  $S$  la estimación de la desviación standard, en este caso dada por  $\sigma$  - ( $\sigma^2$  varianza del error).-

Por lo tanto:

$$LSD = t \frac{\sigma}{\sqrt{n_i}} \sqrt{2}$$

pudiendo ser  $n_i : n$  o  $n'$  según el caso.-

$t$  se obtiene de tablas para una significación del 0,05 y los grados de libertad con que se calculó  $\sigma^2$ .-

Los cálculos para los distintos parámetros se presentan a continuación:

Contenido de sólidos solubles

TIEMPO	TRATAMIENTOS					TOTALES
	1	2	3	4	5	FILAS
1	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	62,5
2	13,5	13,0	14,2	15,1	13,2	69,0
3	13,0	13,5	12,4	12,4	12,1	63,4
4	12,1	12,8	12,6	13,0	13,2	63,7
TOTALES COLUMNAS	51,10	51,8	51,7	53,0	51,0	

$$N = 20; n = 4; n' = 5.-$$

$$\sum X = 258,6$$

$$\frac{(\sum X)^2}{20} = 3343,6980$$

$$\sum T_C^2 = 13.377,34$$

$$\frac{\sum T_C^2}{4} = 3344,3350$$

$$\sum T_F^2 = 16.744,50$$

$$\frac{\sum T_F^2}{5} = 3348,9000$$

$$\sum X^2 = 3.353,82$$

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUAD.MEDIOS
Entre Columnas	$3.344,3350 - 3.343,6980 = 0,6370$	4	0,1593
Entre Filas	$3.348,9000 - 3.343,6980 = 5,2020$	3	1,7340
Error	4,2830	12	0,3569
TOTAL	$3.353,8200 - 3.343,6980 = 10,1220$	19	

#### LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = \frac{0,3569}{4} = 0,0892$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,298$$

$$t_{0,05;12} = 2,179$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,298 \times 1,414 = 0,918$$

#### LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma^2}{n'} = \frac{0,3569}{5} = 0,0714$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n'}} = 0,267$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,267 \times 1,414 = 0,822$$

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS				
	13,250	12,950	12,925	12,775
12,750	0,500	0,200	0,175	0,025
12,775	0,475	0,175	0,150	- - -
12,925	0,325	0,025	- - -	
12,950	0,300	- - -		

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TIEMPOS			
	13,80	12,74	12,68
12,50	1,30 *	0,24	0,18
12,68	1,12 *	0,06	- - -
12,74	1,06 *	- - -	

\* = diferencias significativas

# ACIDEZ TITULABLE

TIEMPO	TRATAMIENTOS					TOTALES FILAS
	1	2	3	4	5	
1	19,20	19,20	19,20	19,20	19,20	96,00
2	11,71	12,86	12,10	12,48	14,21	63,36
3	10,56	10,90	12,10	11,33	11,90	56,79
4	9,79	9,02	10,18	9,22	9,22	47,43
TOTALES COLUMNAS	51,26	51,98	53,58	52,23	54,53	

$$N = 20; n = 4; n^4 = 5$$

$$\sum X = 263,58$$

$$\frac{(\sum X)^2}{20} = 3.473,7208$$

$$\sum T_C^2 = 13.901,8182$$

$$\frac{\sum T_C^2}{4} = 3.475,4546$$

$$\sum T_F^2 = 18.705,1986$$

$$\frac{\sum T_F^2}{5} = 3.741,0397$$

$$\sum X^2 = 3.747,3544$$

FUENTE	SUMA CUADRADOS	G.L.	CUAD.MEDIOS
Entre Columnas	3.475,4546-3.473,7208 = 1,7338	4	0,4335
Entre Filas	3.741,0397-3.473,7208 = 267,3189	3	89,1063
Error	4,5809	12	0,3817
TOTAL	3.747,3544-3.473,7208 = 273,6336	19	

LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = \frac{0,3817}{4} = 0,0954$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,308$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,308 \times 1,414 = 0,949$$

LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma^2}{n'} = \frac{0,3817}{5} = 0,0763$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,276$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,276 \times 1,414 = 0,850$$



DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS				
	13,63	13,40	13,06	13,00
12,82	0,81	0,58	0,24	0,18
13,00	0,63	0,40	0,06	- - -
13,06	0,57	0,34	- - -	
13,40	0,23	- - -		

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TIEMPOS			
	19,20	12,67	11,36
9,49	9,71*	3,18*	1,87*
11,36	7,84*	1,31*	- - -
12,67	6,53*	- - -	

pH

TIEMPO	TRATAMIENTOS					TOTALES FILAS
	1	2	3	4	5	
1	3,55	3,55	3,55	3,55	3,55	17,75
2	3,73	3,54	3,63	3,69	3,74	18,33
3	3,82	3,80	3,28	3,92	4,00	18,82
4	3,78	3,74	3,66	3,98	3,92	19,08
TOTALES COLUMNAS	14,88	14,63	14,12	15,14	15,21	

$$N = 20; n = 4; n' = 5$$

$$\sum X = 73,98$$

$$\frac{(\sum X)^2}{20} = 273,6520$$

$$\sum T_C^2 = 1.095,3894$$

$$\frac{\sum T_C^2}{4} = 273,8474$$

$$\sum T_F^2 = 1.369,2902$$

$$\frac{\sum T_F^2}{5} = 273,8580$$

$$\sum X^2 = 274,2732$$

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUAD. MEDIOS
Entre Columnas	$273,8474 - 273,6520 = 0,1954$	4	0,0489
Entre Filas	$273,8580 - 273,6520 = 0,2060$	3	0,0687
Error	0,2198	12	0,0183
TOTAL	$274,2732 - 273,6520 = 0,6212$	19	

LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = \frac{0,0183}{4} = 0,0046$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,067$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,067 \times 1,414 = 0,22$$

LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma^2}{n'} = \frac{0,0183}{5} = 0,0037$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n'}} = 0,060$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,060 \times 1,414 = 0,186$$

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS				
	3,80	3,78	3,72	3,66
3,53	0,27*	0,25*	0,19	0,13
3,66	0,14	0,12	0,06	- - -
3,72	0,08	0,06	- - -	
3,78	0,02	- - -		

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TIEMPOS			
	3,82	3,76	3,67
3,55	0,27*	0,21*	0,12
3,67	0,15	0,09	- - -
3,76	0,06	- - -	

### CONTENIDO DE TANINOS

TIEMPO	TRATAMIENTOS					TOTALES FILAS
	1	2	3	4	5	
1	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,60
2	0,14	0,11	0,14	0,10	0,09	0,58
3	0,10	0,09	0,13	0,07	0,08	0,47
4	0,25	0,12	0,12	0,04	0,09	0,62
TOTALES COLUMNAS	0,61	0,44	0,51	0,33	0,38	

$$N = 20; n = 4; n' = 5$$

$$\sum X_i = 2,27$$

$$\frac{(\sum X_i)^2}{20} = 0,2576$$

$$\sum T_c^2 = 1,0791$$

$$\frac{\sum T_c^2}{4} = 0,2698$$

$$\sum T_F^2 = 1,3017$$

$$\frac{\sum T_F^2}{5} = 0,2603$$

$$\sum X^2 = 0,2887$$

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUAD.MEDIOS
Entre Tratamientos	$0,2698 - 0,2576 = 0,0122$	4	0,0031
Entre Tiempos	$0,2603 - 0,2576 = 0,0027$	3	0,0009
Error	0,0162	12	0,0014
TOTAL	$0,2887 - 0,2576 = 0,0311$	19	

LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = \frac{0,0014}{4} = 0,00035$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,019$$

$$LSD_{0,05} = 2,179 \times 0,019 \times 1,414 = 0,058$$

LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma^2}{n'} = \frac{0,0014}{5} = 0,00028$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n'}} = 0,017$$

$$LSD_{0,05} = 0,052$$

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS				
	0,152	0,128	0,110	0,095
0,082	0,070*	0,046	0,028	0,013
0,095	0,057	0,033	0,015	- - -
0,110	0,042	0,018	- - -	
0,128	0,024	- - -		

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TIEMPOS			
	0,124	0,120	0,116
0,094	0,030	0,026	0,022
0,116	0,008	0,004	- - -
0,120	0,004	- - -	

### Humedad

TIEMPO	TRATAMIENTOS			TOTALES FILAS
	1	2	3	
1	88,67	88,93	88,25	265,85
2	87,50	80,60	86,70	254,80
3	88,76	87,80	88,28	264,84
Totales Columnas	264,93	257,33	263,23	

$$N = 9; n = n' = 3$$

$$\sum X = 785,49$$

$$\frac{(\sum X)^2}{N} = 68.554,9489$$

$$\sum T_C^2 = 205.696,6667$$

$$\frac{\sum T_C^2}{3} = 68.565,5556$$

$$\sum T_F^2 = 205.739,4881$$

$$\frac{\sum T_F^2}{3} = 68.579,8294$$

$$\sum X^2 = 68.609,0123$$

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUAD.MEDIOS
Entre Tratamientos	$68.565,5556 - 68.554,9489 = 10,6067$	2	5,303
Entre Tiempos	$68.579,8294 - 68.554,9489 = 24,8805$	2	12,440
Error	18,5762	4	4,6441
TOTAL	$68.609,0123 - 68.554,9489 = 54,0634$	8	

LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = 1,5480$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 1,244$$

$$LSD_{0,05} = 2,776 \times 1,244 \times 1,414 = 4,87$$

$$t_{0,05;4} = 2,776$$

LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 1,244$$

$$LSD_{0,05} = 4,87$$

DIFERENCIA ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS		
	88,31	87,74
85,78	2,53	1,96
87,74	0,57	- - -

DIFERENCIA ENTRE MEDIAS TIEMPO		
	88,62	88,28
84,93	3,69	3,35
88,28	0,34	- - -

Pérdida de peso

TIEMPO	TRATAMIENTOS			TOTALES
	1	2	3	FILAS
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	3,23	2,50	2,70	8,43
3	5,25	2,62	4,02	11,89
4	6,25	4,05	5,63	15,93
TOTALES COLUMNAS	14,73	9,17	12,35	

$$N = 12; n = 3; n' = 4$$

$$\sum X = 36,25$$

$$\frac{(\sum X)^2}{12} = 109,5052$$

$$\sum T_C^2 = 453,5843$$

$$\frac{\sum T_C^2}{4} = 113,3961$$

$$\sum T_F^2 = 466,2019$$

$$\frac{\sum T_F^2}{3} = 155,4006$$

$$\sum X^2 = 161,7221$$

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUAD.MEDIOS
Entre Tratamientos	$113,3961 - 109,5052 = 3,8909$	2	1,9455
Entre Tiempos	$155,4006 - 109,5052 = 45,8954$	3	15,2985*
Error	2,4306	6	0,4051
TOTAL	$161,7221 - 109,5052 = 52,2169$	11	



LSD entre tratamientos

$$\frac{\sigma^2}{n} = \frac{0,4051}{4} = 0,1013$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0,318$$

$$t_{0,05;6} = 2,477$$

$$LSD_{0,05} = 2,477 \times 0,318 \times 1,414 = 1,103$$

LSD entre tiempos

$$\frac{\sigma^2}{n'} = \frac{0,4051}{3} = 0,1350$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n'}} = 0,367$$

$$LSD_{0,05} = 2,477 \times 0,368 \times 1,414 = 1,285$$

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TRATAMIENTOS		
	3,682	3,088
2,292	1,390 *	0,796
3,088	0,594	- - -

DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS TIEMPOS			
	5,310	3,963	2,810
0,000	5,310 *	3,963 *	2,810 *
2,810	2,500 *	1,153	- - -
3,963	1,347 *	- - -	

### APENDICE 3

#### Datos agronómicos de las manzanas almacenadas

Variedad: Granny Smith

Productor: Nervi Hnos

Galpón de empaque: FOCO - Pedro Luro

Ubicación del monte: Isla en el Río Negro proximo a Guardia Mitre

Edad de la plantación: 22 años

Marco de la plantación: Tresbolillo

Porta injerto: Pié franco

Fecha de floración: 3 de octubre

Producción media por árbol: 12 cajones de 20 Kg c/u

Ultimo riego antes de cosecha: 6 de marzo

Sistema de formación del árbol: abierto alto

Tratamientos: 1 de polisulfuro; 1 de Sevin; 4 de Azinfes, 2 de Ditane, 1 de  
Parathion y 2 de fertilizante foliar

Naturaleza del suelo: Arenoso franco.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS HORTIFRUTICOLAS FRESCOS EN  
ATMOSFERA CONTROLADA — EFECTO DEL DIOXIDO DE CARBONO  
SOBRE EL PARDEAMIENTO ENZIMATICO DE MANZANAS**

**ALICIA RAQUEL CHAVES**

**1977**